

Université de Montréal

Étude fonctionnelle de lymphocytes T extrathymiques produits  
sous l'effet de l'oncostatin M

Sciences biomédicales  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade Maître ès sciences (M.Sc.)  
en Sciences biomédicales

Avril 2003

©, Gwladys Gérard, 2003



W

4

U58

2003

V.128

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude fonctionnelle de lymphocytes T extrathymiques produits  
sous l'effet de l'oncostatin M

présenté par :

Gwladys Gérard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Nathalie Labrecque  
président-rapporteur

Claude Perreault  
directeur de recherche

Luchino Cohen  
membre du jury

## RÉSUMÉ

Le thymus, principal site de développement des lymphocytes T, subit une involution reliée à l'âge. Alors qu'aucun autre site de maturation n'est capable de peupler la périphérie d'une manière adéquate, la souris transgénique LckOM présente cette qualité. Chez cette souris, la lymphopoïèse T prend place dans les ganglions et offre une exportation T similaire à celle du thymus. La fonction des T LckOM est un paramètre important à étudier pour savoir si ce développement peut remplacer celui du thymus. Des expériences *in vitro* de stimulation avec un anti-TCR avec ou sans costimulation et des immunisations *in vivo* ont été réalisées afin de répondre à cette question. Les T LckOM, qui montrent un phénotype activé, prolifèrent plus rapidement et présentent des fonctions effectrices plus prononcées que les T thymiques. Mais un niveau élevé d'apoptose entrave ces capacités en induisant un épuisement précoce des cellules. Ces études démontrent que le développement intrathymique ne peut être remplacé, du moins par le modèle LckOM.

### Mots clés :

Lymphopoïèse T; thymus; prolifération; apoptose; immunisation; T CD4; T CD8; ganglions.

## ABSTRACT

The thymus, sole site of T lymphocyte development, involutes in an age-dependent manner. While no other maturation site is able to populate adequately the periphery, LckOM transgenic mouse possesses this quality. T lymphopoiesis in this mouse takes place in the lymph node and allows a T cell export similar to that of the thymus. The functionality of these cells is an important parameter to study, in order to know if this development can replace the thymus'. *In vitro* stimulation with an anti-TCR with or without costimulation and *in vivo* immunizations have been performed to answer this question. LckOM T cells, which present an activated phenotype, proliferate more rapidly and show stronger effector functions than their thymic counterparts. Unfortunately, a high apoptosis level impinges on this picture by inducing premature cell exhaustion. These studies demonstrate that intrathymic development can not be replaced.

### Key words :

T lymphopoiesis; thymus; proliferation; apoptosis; immunization; CD4 T cell; CD8 T cell; lymph nodes.

## TABLE DES MATIÈRES

Page titre	i
Identification du jury	ii
Résumé et mots clés	iii
Abstract and key words	iv
Table des matières	v
Liste des abréviations	vii
Remerciements	viii
Introduction	1
Revue de littérature	4
I. Les lymphocytes T conventionnels	4
A. Le développement	4
B. La sélection du répertoire lymphocytaire T	5
i. La voie traditionnelle	5
ii. La voie alternative	6
C. Le répertoire T périphérique	6
i. Les lymphocytes T naïfs	6
ii. Les lymphocytes T mémoires	7
D. L'activation des lymphocytes T	9
i. Les mécanismes	9
ii. Les effecteurs T CD4 <sup>+</sup>	11
iii. Les effecteurs T CD8 <sup>+</sup>	12
iv. La prolifération homéostatique	13
E. La régulation du répertoire périphérique	14
II. Les autres types de lymphocytes T	15
A. Les lymphocytes T classe-Ib restreints	15
B. Les lymphocytes T extrathymiques	16
III. La souris transgénique LckOM	19
A. L'oncostatin M et les membres de sa famille	19
i. Les propriétés des membres de la famille de l'IL-6	19

ii. La souris LIF transgénique	20
B. La souris LckOM	20
i. Le transgène	20
ii. Les caractéristiques morphologiques	21
iii. Le développement T	21
Méthodologie	25
Article	29
Identification de l'article	29
Autorisation des co-auteurs	30
Manuscrit	31
Discussion	75
I. La prolifération <i>in vitro</i>	75
II. L'immunisation <i>in vivo</i>	79
Conclusions	81
Perspectives futures	83
Bibliographie	84



## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

AICD = activation-induced cell death, mort induite par activation

ARNm = ARN messenger

$\beta 2m$  =  $\beta 2$ -microglobuline

CFSE = carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester

CMH = complexe majeur d'histocompatibilité

CPA = cellule présentatrice d'antigène

CTL = cytotoxic T lymphocyte, lymphocyte T  $CD8^+$  activé

DN = lymphocyte T double négatif, donc  $CD4^-CD8^-$

DP = lymphocyte T double positif, donc  $CD4^+CD8^+$

FasL = Fas ligand

GFP = green fluorescence protein

HEV = high endothelial venules, veinules endothéliales

IEL = intra-epithelial lymphocyte, lymphocyte T intra-épithélial

IFN = interferon

IL = interleukine

LCMV = virus de la chorioméningite lymphocytaire

LIF = leukemia inhibitory factor

NKT = lymphocyte T  $NK1.1^+$

OM = oncostatin M

SP = lymphocyte T simple positif, donc soit  $CD4^+$ , soit  $CD8^+$

SVF = sérum de veau fœtal

TCR = T cell receptor ou récepteur des lymphocytes T

Th = T helper, lymphocyte T  $CD4^+$  activé

$T_{MC}$  = lymphocytes T mémoires centraux

$T_{ME}$  = lymphocytes T mémoires effecteurs

VSV = vesicular stomatitis virus

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Claude Perreault, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Cela m'a permis de travailler sur un projet hautement intéressant comprenant de nombreux défis. Grâce à Claude, j'ai côtoyé avec plaisir le merveilleux domaine de l'immunologie. Il m'a de plus appris à garder l'esprit ouvert pour raffiner mon étude, à tirer la « substantifique moelle » des résultats obtenus et à être critique de ces derniers pour une meilleure interprétation.

Je voudrais remercier nos collaborateurs suisses, Rolf Zinkernagel et Marianne Martinic, dont les analyses et les suggestions nous ont permis d'approfondir notre étude des fonctions des lymphocytes T extrathymiques chez la souris LckOM.

Parmi les membres du laboratoire, je tiens particulièrement à remercier Marie-Ève Blais, Sylvie Brochu et Caroline Côté. Marie-Ève a su me montrer de nombreuses techniques pour l'établissement des chimères et pour l'acquisition des données. De plus, son esprit scientifique m'a permis de creuser plus loin l'analyse de mes résultats. Sylvie, grâce à ses connaissances tant théoriques que pratiques, m'a donné la possibilité d'obtenir de meilleurs résultats et de parfaire leur analyse. Je la remercie aussi pour toutes les discussions scientifiques et personnelles que nous avons pu avoir : un brin de clarté et d'amitié dans un monde où les heures ne sont pas comptées. Caroline a donné la chance à toutes les personnes qui étudient la souris LckOM d'avoir un peu plus de temps pour le faire, grâce à son dévouement et au travail qu'elle a fourni pour la colonie elle-même ainsi que dans nos expériences.

Je tiens aussi à remercier tous les autres membres du laboratoire. Leur esprit scientifique a fourni une aide exceptionnelle lors des réunions pour l'interprétation des résultats. Leur soutien moral m'a permis d'aller au bout de tout ce projet. Merci aussi pour les rires, ces petites bulles d'air qui allègent nos tâches.

Je remercie tous mes amis, particulièrement Sarah, et ma famille, qui m'ont donné le courage de m'engager dans ce projet et de le poursuivre jusqu'à son achèvement. Merci pour le temps et la patience qu'ils m'ont offerts tout au long de ces années, et pour la confiance qu'ils m'ont accordée.

Je voudrais aussi remercier mon époux Daniel et mon fils William sans qui rien n'aurait été possible. Leur patience exceptionnelle et leur dévouement m'ont donné le courage d'aller au fond de ce projet et de le réaliser dans un temps raisonnable. Leur amour et leur confiance m'ont permis d'avoir la foi dans mes réalisations et dans mes rêves.

Merci à tous ces gens merveilleux.

## INTRODUCTION

Le thymus, organe principal de la lymphopoïèse T, subit une involution reliée à l'âge de l'organisme. Cette involution est accompagnée d'une réduction de l'aire thymique où prend place la thymopoïèse. Cette partie est graduellement remplacée par du tissu adipeux formé dans l'espace périvasculaire non épithélial <sup>1</sup>. La principale conséquence de ce phénomène est la diminution de l'exportation de lymphocytes T matures nouvellement formés.

Le répertoire T périphérique est constitué d'une population de cellules T naïves et d'une population de cellules T mémoires dont l'homéostasie est régulée de façon indépendante permettant de maintenir un répertoire diversifié au maximum <sup>2,3</sup>. Si l'homéostasie des cellules T mémoires est régulée par l'expansion homéostatique, celle des lymphocytes T naïfs est maintenue par un export thymique continu et la compétition pour les facteurs de survie et de croissance <sup>3-6</sup>.

Plusieurs études montrent que l'export thymique de lymphocytes T nouvellement formés est indépendant : 1) de la taille du compartiment périphérique <sup>4,7,8</sup>, 2) du ratio CD4/CD8 périphérique <sup>4</sup>, 3) du nombre ou de la taille de thymus présents dans l'organisme <sup>7</sup>, 4) du niveau de lymphocytes T exportés circulant en périphérie <sup>7</sup>. Par conséquent, une baisse du répertoire naïf périphérique n'aura aucune influence sur l'export de cellules T du thymus.

Donc, l'involution thymique a une conséquence négative directe sur la diversité du répertoire en périphérie en diminuant sa diversité. Ceci entraîne une augmentation de l'incidence d'infections et de maladies chez les individus âgés (cancers et maladies auto-immunitaires) <sup>9</sup>.

Bien que l'existence d'une lymphopoïèse T extrathymique ait été montrée <sup>10,11</sup>, cette production lymphocytaire est malheureusement insuffisante et incapable de compenser l'involution thymique <sup>9</sup>.

L'oncostatin M (OM) est une cytokine pléiotropique appartenant à la famille de l'IL-6. Elle est principalement produite par les lymphocytes T activés et les macrophages et est reconnue pour avoir une action anti-inflammatoire <sup>12</sup>. Chez la souris, l'exposition chronique à cette cytokine entraîne un changement drastique des

ganglions lymphatiques tant au niveau fœtal que chez l'adulte : les ganglions sont transformés en organes lymphoïdes de type primaire capables de supporter le développement des lymphocytes T, et de permettre l'exportation suffisante de ces cellules afin de peupler les organes lymphoïdes secondaires, tout ceci d'une façon similaire à celle d'un thymus<sup>13;14</sup>.

La souris transgénique LckOM est une souris dans laquelle le gène bovin de l'OM a été inséré sous l'influence du promoteur proximal du gène p56<sup>Lck</sup> dans des thymocytes<sup>13</sup>. Ces souris sont caractérisées, premièrement, par une hypoplasie thymique accompagnée d'un très faible nombre de lymphocytes T immatures et une accumulation de lymphocytes B, suggérant que le thymus, dans ce cas-ci, ne supporte pas le développement des lymphocytes T. Deuxièmement, la cellularité des ganglions d'une souris LckOM de 12 semaines est 30 fois celle d'une souris contrôle (souris B6). Ceci est principalement causé par une accumulation massive de lymphocytes double-positifs (DP) CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. La rate de ces souris montre aussi une hypercellularité par rapport aux souris contrôles, due essentiellement à une accumulation de lymphocytes B. Seule une très faible augmentation de lymphocytes DP dans la rate a été notée. Toutes ces observations montrent que, dans la souris LckOM, les ganglions constituent les sites de développement des lymphocytes T<sup>14</sup>.

Les lymphocytes T matures, chez la souris LckOM, montrent aussi un phénotype particulier. La plupart des T CD4<sup>+</sup> sont CD44<sup>high</sup>, CD45RB<sup>low</sup>, CD62L<sup>low</sup>, IL-2Rβ<sup>low</sup>, phénotype correspondant à celui des lymphocytes T après engagement du TCR par un antigène du soi ou étranger. La grande majorité des T CD8<sup>+</sup> est CD44<sup>high</sup>, CD45RB<sup>high</sup>, CD62L<sup>high</sup>, IL-2Rβ<sup>high</sup><sup>14</sup>. Ce phénotype est similaire à celui trouvé sur des lymphocytes T mémoires réexprimant le CD62L<sup>14</sup>, ou à celui de lymphocytes T provenant d'une expansion homéostatique<sup>15</sup>.

Outre ces caractéristiques particulières et impressionnantes, une question importante doit être élucidée afin d'établir si le modèle LckOM peut être le point de départ de la mise en place d'un traitement visant à compenser l'involution thymique. En effet, il est nécessaire de savoir si les lymphocytes T extrathymiques produits sous l'effet de l'OM sont fonctionnels. Plus spécifiquement, ce travail vise à répondre aux questions suivantes : est-ce-que les lymphocytes T extrathymiques produits sous

l'influence de l'OM sont capables de proliférer suite à un engagement du TCR *in vitro*? est-ce-que la prolifération de ces lymphocytes permet d'obtenir des effecteurs au même titre que celle de cellule T d'origine thymique? la réponse des lymphocytes T extrathymiques à une immunisation *in vivo* est-elle aussi efficace que celle de leur contre-partie thymique?

## REVUE DE LA LITTÉRATURE

### I. Les lymphocytes T conventionnels

#### A. Le développement

Les premières expériences démontrant le rôle crucial du thymus dans le développement du système immunitaire ont été réalisées dans le début des années 1960. En effet, la thymectomie chez des souris entraîne une déficience en lymphocytes et une grande susceptibilité aux infections. C'est dans cet organe que prend place le développement des lymphocytes T <sup>16</sup>.

Les progéniteurs qui donneront naissance aux cellules T sont formés dans la moelle osseuse puis migrent jusqu'au thymus via le sang. Une fois dans le thymus, les cellules souches se commettent à la lignée T sous l'influence de différents signaux du microenvironnement thymique. Trois étapes majeures, caractérisées par l'expression des co-récepteurs CD4 et CD8, sont nécessaires pour l'obtention de lymphocytes T matures naïfs capables de générer une réponse contre des pathogènes <sup>3;16;17</sup>.

Le premier stade est celui des cellules CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, dites double négatives (DN). Ces cellules subissent un réarrangement génétique afin d'exprimer le récepteur des lymphocytes T (TCR). Ce réarrangement passe d'abord par l'expression de la chaîne  $\beta$  du TCR, testée en association avec le pré-T $\alpha$ . Cette étape, la  $\beta$ -sélection, permet d'initier le réarrangement de la chaîne  $\alpha$  du TCR et d'exprimer les co-récepteurs CD4 et CD8, après une vague de prolifération des DN dépendante de l'interleukine (IL) -7 <sup>3;16-18</sup>. À ce moment là, les DN se différencient en lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ou double positifs (DP) <sup>3;16;17</sup>.

La deuxième étape se caractérise par la sélection du TCR exprimé par les DP, et permet d'obtenir des lymphocytes T matures capables de reconnaître les antigènes étrangers sans réagir avec les antigènes du soi (tolérance du soi). À cet effet, les DP sont sujets à des événements sévères de sélections positive et négative afin que seules les cellules ayant un TCR avec le potentiel de reconnaître des peptides étrangers dans

le contexte de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du soi seront amenées à se différencier <sup>16</sup>.

La dernière étape est la différenciation des DP en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, nommés aussi lymphocytes simple positifs (SP). Ces cellules sortiront du thymus pour migrer en périphérie où ils formeront le compartiment de lymphocytes T naïfs.

## **B. La sélection du répertoire lymphocytaire T**

### i. La voie traditionnelle

La sélection du TCR présent sur les lymphocytes T est un phénomène complexe qui permet la génération d'un répertoire T capables de réagir en présence d'un antigène étranger sans endommager l'hôte en reconnaissant les peptides antigéniques du soi <sup>19</sup>. Elle se produit par l'interaction du TCR avec un complexe peptide du soi/CMH exprimé à la surface des cellules stromales du thymus et décide du devenir des DP. Deux types de sélection des DP prennent place dans le thymus : la sélection positive et la sélection négative. Ces deux événements se produisent en fonction de la force d'interaction entre le TCR et le complexe peptide/CMH <sup>16;17</sup>.

La sélection positive permet, tout d'abord, la restriction du CMH. En effet, les DP dont le TCR est incapable d'interagir avec le CMH des cellules épithéliales thymiques seront éliminées par négligence. Près de 90% des DP vont être éliminés de cette manière et seulement 5% se différencieront en SP <sup>3;16;17</sup>. Afin d'optimiser les opportunités de sélection positive, les DP subissent un intense réarrangement de la chaîne  $\alpha$  du TCR <sup>3;16</sup>. La sélection positive permet aussi de décider du devenir des lymphocytes DP, en ce sens qu'ils n'exprimeront que le co-récepteur CD4 ou CD8 selon que la liaison via le TCR s'est produite sur un CMH de classe II ou de classe I, respectivement <sup>3;17</sup>.

La sélection négative des DP se produit lors d'une forte interaction entre le TCR et le complexe peptide/CMH présent sur les cellules dendritiques thymiques



<sup>3;16;20</sup>. Elle peut avoir lieu à différents stades de maturation des lymphocytes T et permet l'élimination des cellules autoréactives par apoptose, apportant ainsi la tolérance du soi <sup>21;22</sup>.

## ii. La voie alternative

La sélection positive des DP est médiée principalement par les cellules épithéliales corticales thymiques. Ces dernières permettent de donner les signaux adéquats, par des interactions soutenues, aux lymphocytes T en développement pour leur maturation <sup>16</sup>.

Par contre, il a récemment été établi que les cellules hématopoïétiques dans le thymus pouvaient diriger la sélection positive des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> : les cellules T résultant d'une telle sélection sont fonctionnelles et ont un phénotype similaire à celui de lymphocytes ayant subi leur sélection positive sur des cellules épithéliales corticales <sup>23;24</sup>. De plus, tout dernièrement, une étude chez des souris chimères tétraparentales a permis de montrer que des lymphocytes T, dont la sélection positive a été médiée par des cellules non-épithéliales thymiques, étaient capables de générer une réponse antivirale efficace et protectrice. Ces expériences prouvent que des cellules autres que les cellules épithéliales thymiques sont efficaces pour sélectionner un répertoire T mature et fonctionnel <sup>25</sup>.

## **C. Le répertoire T périphérique**

### i. Les lymphocytes T naïfs

Une fois la maturation complétée, les progéniteurs T sont devenus des lymphocytes T SP CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> matures mais naïfs, en ce sens qu'ils n'ont pas encore rencontré l'antigène étranger pour lequel ils sont spécifiques. À ce stade, les lymphocytes T vont alors quitter le thymus et entrer dans la circulation pour atteindre les différents organes lymphoïdes secondaires, tels la rate et les ganglions <sup>3</sup>.

Les lymphocytes T naïfs sont des cellules au repos <sup>2</sup> qui recirculent continuellement du sang à la lymphe en passant par les zones T spécialisées des organes lymphoïdes secondaires dans l'attente d'une rencontre avec un antigène étranger <sup>26</sup>. L'entrée dans les divers organes secondaires se produit soit de façon non-spécifique pour la rate, soit de façon très spécialisée pour les ganglions lymphatiques, via les veinules endothéliales (HEV) et grâce à des récepteurs exprimés par les cellules T (CCR7 et CD62L) <sup>27</sup>.

Une fois dans les organes secondaires, les lymphocytes T vont recevoir deux types de signaux. Le premier type est le signal de survie qui a lieu en tout temps et permet aux lymphocytes T de continuer à circuler à travers tout l'organisme. Il se produit grâce à l'interaction entre le CMH exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et le TCR <sup>2;26;28-33</sup> et implique aussi la présence de différentes cytokines, en particulier l'IL-7 <sup>3;26;33-36</sup>.

Le deuxième type est le signal d'activation dont il sera question plus bas. Sans ce dernier, les lymphocytes T ont un taux de prolifération faible et une durée de vie relativement longue qui est de l'ordre de mois <sup>37</sup>.

## ii. Les lymphocytes T mémoires

Suite à une activation, une partie des lymphocytes T naïfs qui auront proliféré vont survivre et se différencier en cellules mémoires. Ces changements impliquent l'expression non seulement de marqueurs de surface : les CD4 mémoires sont CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup>CD45RB<sup>low</sup>LFA-1<sup>high</sup> <sup>38-40</sup> et les CD8 mémoires CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup>CD122<sup>high</sup>Ly6C<sup>high</sup> <sup>39;39</sup>; mais aussi de gènes permettant aux lymphocytes mémoires de répondre plus rapidement à une deuxième rencontre avec l'antigène <sup>41</sup>.

L'existence de deux populations de lymphocytes T mémoires a récemment été montrée : les lymphocytes T mémoires effecteurs (T<sub>ME</sub>) et les lymphocytes T mémoires centraux (T<sub>MC</sub>). Les premiers se retrouvent principalement dans les organes non-lymphoïdes tels que la peau, les poumons ou les intestins, alors que les derniers ont un patron de migration relativement similaire à celui des lymphocytes naïfs <sup>42-46</sup>.

En plus de leur site de résidence, les deux populations de cellules T mémoires semblent avoir des fonctions effectrices différentes. En effet, les T<sub>ME</sub> ont une activité lytique directe *ex vivo*, produisent principalement de l'interferon (IFN)- $\gamma$  et se divisent peu. Ils seraient responsables d'une réponse immédiate au site même d'infection contre une deuxième attaque par un pathogène. Par contre, les T<sub>CM</sub> produisent surtout de l'IL-2, ne montrent pas d'activité lytique directe *ex vivo* mais prolifèrent rapidement après stimulation. Ils permettent de reconstituer plus efficacement que les cellules T naïves la population de lymphocytes effecteurs afin d'éliminer le pathogène d'une manière plus prompte<sup>43;44;46;47</sup>.

La capacité des lymphocytes T mémoires à répondre rapidement et efficacement contre une deuxième rencontre avec un pathogène est liée à des changements qui ont lieu lors d'une première activation des cellules T naïves. Comparés à ces derniers, les cellules mémoires expriment de façon constitutive l'ARN messager (ARNm) de plusieurs molécules effectrices, tels l'IL-2 (CD4 et CD8)<sup>28;38</sup>, l'IFN- $\gamma$ , Fas ligand (FasL), perforine et granzyme (CD8)<sup>28;41</sup>. De plus, la machinerie de signalisation menant à l'activation cellulaire est couplée à l'engagement du TCR de façon beaucoup plus efficace chez les lymphocytes T mémoires que chez les naïfs<sup>48</sup>. Enfin, l'expression de certains récepteurs à la surface des cellules mémoires entraîne une migration rapide de celles-ci au site d'infection<sup>41;49</sup>. Ceci permet donc aux lymphocytes T mémoires d'acquérir des fonctions effectrices rapidement sans différenciation majeure préalable.

Alors que leur survie ne nécessite pas l'interaction TCR-CMH<sup>3;28</sup>, l'homéostasie des cellules T mémoires est régulée en grande partie par l'action de cytokines. En effet, l'IL-15 est le principal facteur responsable de la survie et du taux de prolifération des CD8 mémoires<sup>26;33;50;51</sup>. Par contre, les facteurs régulant l'homéostasie des CD4 mémoires sont encore peu connus.

## D. L'activation des lymphocytes T

L'activation d'un lymphocyte T naïf, suite à la rencontre avec un antigène étranger, entraîne toute une cascade de changements internes qui permettent à la cellule engagée de proliférer de façon intensive et de se différencier. Tout ceci a lieu dans le seul but de répondre adéquatement au type de pathogène qui infecte l'hôte. En effet, la réponse immunitaire sera dirigée différemment en fonction de l'agent infectieux et de son mode de réplication.

### i. Les mécanismes

#### *La phase d'activation.*

La présentation initiale de l'antigène étranger est apportée par les cellules dendritiques qui représentent le meilleur activateur des lymphocytes T <sup>41</sup>. En effet, les cellules dendritiques immatures capturent l'antigène au site d'infection, le traitent pour le présenter dans la niche des CMH et migrent jusqu'aux zones T des ganglions lymphatiques les plus proches <sup>27</sup>. Pour agir de façon optimale, les cellules dendritiques ont besoins d'être activées car au repos, elles possèdent de faibles niveaux de CMH et de molécules servant à la co-stimulation des cellules T à leur surface. Les cytokines inflammatoires relâchées au site d'infection, et les produits bactériens permettent de stimuler les cellules dendritiques augmentant ainsi l'expression du CMH et des molécules de co-stimulation <sup>52</sup>. De plus, les IFN, qui ont une activité immunomodulatoire, régulent l'immunité innée et acquise en activant l'expression du CMH sur les CPA <sup>53</sup>.

Dans les ganglions, la reconnaissance de l'antigène lié au CMH sur les cellules dendritiques par le TCR des lymphocytes T circulant entraîne la séquestration de ces derniers <sup>26;27</sup>. Mais pour qu'une cellule T soit définitivement activée et prolifère, il est nécessaire qu'elle reçoive un deuxième signal d'activation de la part de la CPA. Celui-ci est apporté par les molécules de co-stimulation, tel le CD28 qui reconnaît B7-1 ou B7-2 présents à la surface des cellules dendritiques activées <sup>27;54</sup>.

Cette interaction, en plus de fournir le deuxième signal nécessaire à l'engagement des lymphocytes T, influence l'évolution de la réponse immunitaire <sup>55</sup>.

*La phase d'expansion.*

L'activation adéquate des cellules T entraîne une cascade d'événements intracellulaires qui mèneront dans un premier temps à l'expansion clonale des cellules engagées, et dans un deuxième temps à la différenciation de celles-ci en effecteurs qui migreront au site d'infection et élimineront le pathogène <sup>54</sup>.

Puisque très peu de lymphocytes T naïfs sont spécifiques pour un antigène donné, la prolifération suite à une activation permet d'augmenter ce nombre d'une manière considérable afin d'obtenir une réponse maximale contre le pathogène. En effet, les cellules T engagées sont capables de subir une expansion de plus de 1000 fois en quelques jours <sup>26</sup>. D'après certaines études récentes, les lymphocytes T CD8 n'auraient besoin que d'une brève stimulation (de l'ordre de quelques heures) pour être engagés dans une phase d'expansion clonale intense, autonome et indépendante de l'antigène qui ne peut être interrompue <sup>56-58</sup>. Bien que certaines expériences montrent que cette prolifération est dépendante de l'IL-15 <sup>51</sup>, d'autres papiers concernant la réponse des cellules T CD8 dans des souris déficientes en IL-15 ou en son récepteur indiquent que cette cytokine ne serait pas essentielle <sup>59;60</sup>. De plus, à tout le moins dans une infection contre *Listeria monocytogenes*, la phase d'expansion serait dépendante de la dose d'infection initiale et du taux d'élimination du pathogène <sup>61</sup>.

Tel que mentionné plus haut, la phase d'expansion est accompagnée d'une différenciation des lymphocytes T en cellules effectrices capables de produire toute une panoplie de molécules nécessaires à la régulation de la réponse immunitaire. La première cytokine produite lors d'une réponse primaire est l'IL-2 (dans les premières 24 heures pour les CD4), et son récepteur est exprimé à la surface des cellules T dès leur activation <sup>38</sup>. L'IL-2 est sécrétée rapidement car, étant le principal facteur de croissance des lymphocytes T, elle agit en stimulant l'expansion clonale de ces dernières d'une manière autocrine et paracrine. Les différentes caractéristiques des lymphocytes T effecteurs seront discutées plus bas.

En acquérant leurs fonctions effectrices, les lymphocytes T activés exprimeront plusieurs récepteurs nécessaires à leur dissémination à travers tout l'organisme, en particulier le site d'infection, afin d'éliminer efficacement le pathogène <sup>62</sup>. Cette migration est médiée entre autre par des sélectines et d'autres récepteurs (CCR5 et CCR2) nécessaires à l'entrée des cellules T dans les organes non-lymphoïdes <sup>41;63</sup>.

#### *La phase de contraction.*

À la fin d'une réponse immunitaire et pour éviter toute surcharge inutile, la majorité des lymphocytes T effecteurs sont éliminés par un processus d'apoptose <sup>54</sup>. Cette mort cellulaire induite par l'activation (AICD) concerne 90% des effecteurs et est médiée par la voie de Fas via la dissociation de c-FLIP, molécule d'inhibition de l'apoptose. De plus, l'IL-2 apparaît être en partie responsable de la mort des effecteurs <sup>26</sup>. Le début et la cinétique de la phase de contraction des CD8 semblent être indépendants de l'ampleur de la phase d'expansion ou de la dose de pathogène et de la durée de l'infection <sup>61</sup>.

Par contre, si la majorité des cellules effectrices seront amenées à être éliminées au terme d'une réponse immunitaire, une partie (environ 5 à 10% des effecteurs au pic de la réponse) survivra pour constituer la population de lymphocytes T mémoires spécifiques au pathogène <sup>26;27</sup>. Celle-ci pourra, lors d'une deuxième rencontre avec le pathogène, agir plus rapidement et efficacement que la population de cellules T naïves.

#### ii. Les effecteurs T CD4<sup>+</sup>

Les CD4, ou T helper (Th), sont d'importants producteurs de cytokines dont il existe deux grandes familles qui se définissent principalement par la panoplie de molécules qu'ils sécrètent.

Les Th1 se développent généralement en présence d'IL-12. Les cytokines qu'ils produisent sont surtout l'IL-2, l'IFN- $\gamma$  et la lymphotoxine. Ils favorisent l'immunité dite cellulaire (cytotoxicité, T CD8) et phagocytaire et induisent des

réponses d'hypersensibilité de type retardée. De plus, ils seraient responsables de pathologies autoimmunitaires <sup>64;65</sup>.

Pour leur part, les Th2 se développent surtout en présence d'IL-4. Ils sécrètent principalement l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13. Ils médient les réponses de type humoral (production d'anticorps, cellules B), non-phagocytaire et extra-cellulaire. Ils auraient aussi un rôle dans les réponses allergiques directes et inflammatoires <sup>64;65</sup>.

La polarité des CD4 est un phénomène complexe et encore obscur. Par contre, la durée de stimulation du TCR semble jouer un rôle crucial en influençant la réponse aux cytokines polarisantes et en permettant aux cellules d'acquiescer leurs fonctions effectrices <sup>66</sup>. De plus, le cycle cellulaire apparaît être un facteur important pour l'expression de certaines cytokines. En effet, l'expression de l'IFN- $\gamma$  augmente avec le nombre de divisions cellulaires, alors qu'un seuil de trois divisions est requis pour l'IL-4. En outre, l'entrée dans le cycle cellulaire est nécessaire pour l'expression tant d'IFN- $\gamma$  que d'IL-4 <sup>65</sup>.

### iii. Les effecteurs T CD8<sup>+</sup>

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (CTL) sont, pour leur part, principalement cytotoxiques : une fois activés, ils éliminent les cellules infectées en induisant leur apoptose. Deux grandes voies sont utilisées pour cette tâche : la voie des perforine-granzyme et la voie de Fas/FasL, qui <sup>67</sup>.

Pendant leur différenciation en effecteurs, les CD8 acquiescent les capacités de lyser les cellules infectées : des granules contenant les molécules d'apoptose sont accumulés dans le cytoplasme des CTL prêts à être utilisés. Lors de l'engagement du récepteur en reconnaissant une cellule infectée, les CTL réorientent ces granules vers la région d'activation et relâchent leur contenu dans la région de contact avec la cellule cible. Une des molécules libérées est la perforine. Celle-ci, en présence de calcium, se polymérise sur la membrane cible et forme une structure en anneau contenant un pore central à travers lequel d'autres enzymes pourront passer <sup>67</sup>. Parmi les autres molécules relâchées se trouvent les granzymes, dont la plus connue est la granzyme B. Cette dernière entre dans la cellule cible, apparemment grâce à un

récepteur spécifique, et active certaines caspases amenant ainsi l'activation de la cascade apoptotique cellulaire et la mort de la cellule infectée <sup>68</sup>. La voie des perforine/granzyme est la plus utilisée par les CTL et a un rôle majeur dans l'élimination de virus <sup>69</sup>.

Après activation et différenciation en effecteurs, les lymphocytes T CD8 expriment les molécules adéquates nécessaires à la voie de Fas/FasL. Celles-ci sont les ligands de la famille des TNF qui, après chaque utilisation par les CTL, doivent être synthétisés de nouveau. Lorsque déclenchée, cette voie mène à l'activation des caspases grâce au récepteur Fas qui, exprimé par la cellule cible, se dissocie de la molécule c-FLIP (inhibiteur d'apoptose) <sup>67</sup>. La voie de Fas/FasL aurait un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire <sup>69</sup>.

#### iv. La prolifération homéostatique

Les lymphocytes T naïfs peuvent aussi être stimulés en absence d'antigène étranger. En effet, dans des conditions de lymphopénie, les cellules T sont amenées à proliférer lentement et à acquérir des caractéristiques similaires à celles des lymphocytes T mémoires sans la transition en effecteurs <sup>15;33;70</sup>.

Cette prolifération s'accompagne d'un changement du phénotype des lymphocytes T naïfs : augmentation du CD44, du CD122 et du Ly6C et diminution du CD45RB <sup>15;33;70</sup>. Par contre, les marqueurs précoces d'activation ne sont pas surexprimés comme dans le cas d'une activation par un antigène étranger (T effecteurs) <sup>70</sup>.

De plus, les cellules T ayant subi une prolifération homéostatique acquièrent des fonctions effectrices semblables à celles des lymphocytes T mémoires. Ils répondent à une stimulation par un antigène étranger plus promptement que les cellules T naïves, acquièrent le pouvoir de sécréter rapidement de l'IFN- $\gamma$  et montrent des fonctions cytotoxiques <sup>15;33;70</sup>.

Cette prolifération nécessite les mêmes signaux qui permettent la survie des lymphocytes T naïfs dans une situation normale : l'interaction du TCR avec les peptides du soi liés aux CMH des CPA <sup>70</sup> et la présence d'IL-7 <sup>35;36</sup>. En outre, les co-



récepteurs CD4 et CD8 semblent contribuer à l'expansion homéostatique des lymphocytes T naïfs<sup>33</sup>.

### **E. La régulation du répertoire périphérique**

Le compartiment T périphérique est constitué de lymphocytes T naïfs et mémoires, dont l'homéostasie est régulée de façon indépendante. En effet, les premiers sont dépendants de l'exportation de lymphocytes T nouvellement formés dans le thymus, alors que les seconds sont régulés par leur taux de prolifération<sup>3;4;6</sup>. Cette division du compartiment T périphérique en deux populations distinctes dont la régulation est indépendante permet le maintien de la diversité du répertoire T<sup>2;3</sup>.

Par contre, la population naïve résidant en périphérie et les lymphocytes T nouvellement exportés du thymus semblent compétitionner pour les mêmes niches, puisque, dans une étude sur des chimères hématopoïétiques, il a été montré que l'exportation de cellules T du thymus s'accompagne d'un déclin graduel des cellules T naïves périphériques résidentes<sup>8</sup>. Ceci entraîne une substitution au hasard des lymphocytes T naïfs en périphérie. La principale conséquence de ce phénomène est l'obtention d'un répertoire de cellules T naïves plus diversifié, permettant, d'une part, de répondre à un spectre plus large de pathogènes, et d'autre part, de maintenir le niveau de lymphocytes T autoréactifs au minimum<sup>8</sup>.

## **II. Les autres types de lymphocytes T**

### **A. Les lymphocytes T classe-Ib restreints**

Parmi les lymphocytes sélectionnés dans le thymus, il existe une population de lymphocytes T restreinte aux CMH de classe Ib (les CD8 conventionnels sont sélectionnés par les CMH de classe Ia). Cette classe comprend, chez la souris, les molécules H2-M3, Qa-1, Qa-2 et CD1d, et chez l'humain, les molécules HLA-E, HLA-F, HLA-G, CD1a et CD1d. Une des principales différences des CMH-Ib par rapport aux CMH-Ia est leur polymorphisme limité <sup>71</sup>.

Les CD8 sélectionnés sur les CMH-Ib présentent un phénotype activé même dans une souris non-infectée. En effet, ces cellules sont CD44<sup>high</sup>CD122<sup>high</sup>Ly6C<sup>high</sup>CD11a<sup>high</sup> <sup>71</sup>. Ce phénotype serait dû aux particularités de leur développement intrathymique : dans une étude réalisée avec des chimères hématopoïétiques, il a été montré que, lorsque sélectionnés par des cellules hématopoïétiques, les CD8 CMH-Ib restreints présentaient un phénotype plus activés que lorsque la sélection a lieu sur des cellules non-hématopoïétiques <sup>71</sup>. De plus, comparés aux CD8 CMH-Ia restreints, ces lymphocytes sont sélectionnés par des cellules hématopoïétiques d'une manière efficace (au moins pour les CD8 H2-M3) <sup>71</sup>.

Les fonctions effectrices des CD8 CMH-Ib restreints diffèrent aussi de celles des CD8 CMH-Ia restreints. En effet, lors d'une réponse contre *Listeria monocytogenes*, le pic d'expansion des CD8 H2-M3 apparaît plus tôt que celui des CD8 conventionnels <sup>72</sup>. En outre, ces cellules sont capables de produire de l'IFN- $\gamma$  très rapidement après stimulation *in vivo* avec de l'anti-CD3, ce qui activerait la voie des Th1 <sup>71</sup>. Par contre, les CD8 CMH-Ib restreints participent de façon limitée à la génération de la réponse mémoire, bien qu'ils soient aptes à apporter une protection significative contre une infection subséquente <sup>72</sup>.

Parmi les lymphocytes T restreints par le CMH-Ib, certains lymphocytes, les NKT, expriment, en plus de molécules spécifiques à la lignée T, des marqueurs retrouvés sur des cellules NK. Majoritairement CD4<sup>+</sup> ou DN, les NKT sont principalement générés dans le thymus <sup>73-76</sup> et leur répertoire est fortement

sélectionné par sa spécificité pour le CD1<sup>73;77</sup>. Le récepteur IL-2R $\beta$ /IL-15R $\alpha$  (CD122) semble être essentiel pour le développement des NKT<sup>50;75</sup>.

Les NKT restreints par le CD1 expriment une chaîne  $\alpha$  du TCR invariable, la V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 281, le plus souvent associée avec le V $\beta$ 8 du TCR $\beta$ <sup>73</sup>. Leur phénotype partage des caractéristiques à la fois de lymphocytes T mémoires (CD44<sup>high</sup>CD45RB<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup>) et de cellules NK (NK1.1<sup>int</sup>CD122<sup>int</sup>). De plus, presque tous les NKT sont TCR<sup>int</sup><sup>73;75</sup>.

Après stimulation, les NKT sécrètent de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-4<sup>73;78</sup>. De plus, ils sont capables de fonctions cytolytiques via la voie de Fas/FasL<sup>73</sup>. Comme ils expriment le CD28, leurs réponses peuvent être modulées par les molécules B7. Enfin, les NKT sont reconnus pour être des immunomodulateurs grâce à la production de cytokines et pour leur action anti-tumorale<sup>73</sup>.

## **B. Les lymphocytes T extrathymiques**

Des études chez des souris nude, dont la génération des lymphocytes T conventionnels dans le thymus est impossible, ont montré l'existence d'un développement extrathymique des cellules T<sup>79</sup>. Celui-ci prend place principalement au niveau des ganglions mésentériques et dans une moindre mesure dans les intestins<sup>80</sup>.

Le processus de maturation des lymphocytes T extrathymiques est différent de celui des lymphocytes conventionnels. En effet, dans une étude réalisée avec des souris Rag-GFP (green fluorescence protein), dans laquelle les cellules lymphopoïétiques immatures expriment fortement la GFP pour la perdre progressivement au cours de leur développement, il a été montré que la lymphopoïèse extrathymique semble être plus lente que sa contre-partie thymique (l'analyse des différents stades de DN montrent l'accumulation de cellules moins différenciées dans les ganglions mésentériques) et biaisée vers la synthèse de la chaîne  $\gamma\delta$  du TCR<sup>80</sup>. De plus, dans cette même étude, la comparaison entre les DP et les SP thymiques et extrathymiques montrent qu'avec l'âge, une accumulation de DP immatures et de SP

dont le contenu en cellules GFP<sup>+</sup> s'amenuise, a lieu dans les ganglions mésentériques, laissant supposer que le passage de DP en SP est défectueux<sup>80</sup>. Enfin, une expansion des populations SP semble avoir lieu. Ceci est suggéré d'une part par le phénotype activé des CD4 (CD45RB<sup>low</sup>) et d'autre part par l'étude de la diversité du TCRβ des DP et des SP : alors que les premiers montrent un répertoire polyclonal, les derniers ont un répertoire oligoclonal limité<sup>80</sup>.

Les lymphocytes T extrathymiques montrent un phénotype activé : CD44<sup>high</sup>CD122<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup>LFA-1<sup>high</sup>; exprimant des niveaux intermédiaires de CD3<sup>81-83</sup>. Ces cellules se retrouvent dans plusieurs organes dont le foie, la rate, les ganglions, la moelle osseuse et le thymus<sup>82</sup>.

Cette population particulière de lymphocytes prolifère en réponse à un anti-TCR<sup>83</sup>, à l'IL-2 ou l'IL-15<sup>81</sup>. Après stimulation, ces cellules produisent de l'IFN-γ<sup>81;83</sup> et sont capables d'activité cytotoxique médiée par Fas/FasL<sup>82</sup>. De plus, lors d'une infection par la malaria, les lymphocytes T extrathymiques vont subir une forte expansion dans le foie et la rate et sont aptes, après transfert dans un hôte non immunisé, à protéger contre une infection<sup>82;84</sup>. Par contre, ces lymphocytes T montrent une tendance plus forte à l'apoptose *in vitro* et *in vivo*<sup>81;85</sup>.

Au niveau de l'épithélium intestinal, il existe aussi une population particulière de lymphocytes T : les cellules T intra-épithéliales ou IEL. Par contre, bien que plusieurs études aient suggéré qu'une partie de ces derniers pouvait être générée en absence du thymus<sup>86-89</sup>, leur origine est remise en question par des travaux récents.

Ces lymphocytes sont sujets à des mécanismes de sélection distincts de ceux observés dans le thymus, bien que la reconnaissance d'un antigène du soi lié au CMH soit nécessaire pour leur génération<sup>88</sup>. Tout d'abord, les IEL sont surtout sélectionnés positivement par les antigènes du soi, plutôt que sélectionnés négativement. Ceci entraîne la génération d'une forte population de lymphocytes T auto-réactifs<sup>87-89</sup>. Par contre, l'étude chez des souris chimères thymectomisées et irradiées montrent l'existence d'une sélection négative lorsque la progression dans le développement mène à l'expression d'un TCR fonctionnel<sup>87</sup>. Ensuite, la β2m est essentielle à la génération des IEL mais, contrairement à celle des lymphocytes conventionnels, ne

nécessite pas la protéine lck et le CMH de classe II. Enfin, la cinétique d'apparition des IEL dépend du stade de développement de l'intestin <sup>87</sup>.

Différentes populations de lymphocytes sont retrouvées au niveau de l'intestin. En effet, une majorité des IEL sont CD8<sup>+</sup> avec un TCRαβ ou un TCRγδ ayant un répertoire particulier et une minorité sont des DN. Par contre, contrairement aux CD8 conventionnels qui sont CD8αβ, les IEL CD8<sup>+</sup> TCRαβ expriment le CD8αα <sup>89</sup>. Le patron de migration des IEL est différent de celui des T conventionnels puisqu'ils ont un accès restreint aux organes lymphoïdes <sup>87</sup>.

Au niveau de leurs fonctions, les IEL ont la capacité à promouvoir un changement isotypique des B pour favoriser la production d'anticorps IgA <sup>87</sup>. De plus, ils sont cytolytiques et aptes à sécréter des cytokines. Enfin, les IEL γδ induisent la guérison des blessures épithéliales via la production de facteurs de croissance des fibroblastes et régulent la maturation et l'homéostasie de l'intestin <sup>89</sup>.

### **III. La souris transgénique LckOM**

#### **A. L'oncostatin M et les membres de sa famille**

##### **i. Les propriétés des membres de la famille de l'IL-6**

La famille de l'IL-6 comprend de nombreux facteurs de croissance dont l'IL-6, LIF (leukemia inhibitory factor) et l'oncostatin M (OM). Tous les membres de cette famille utilisent un récepteur contenant la chaîne commune gp130. Les actions de ces cytokines sont très diverses tant sur les systèmes immunitaire et hématopoïétique que sur les systèmes nerveux central et cardiovasculaire<sup>90</sup>.

L'IL-6 stimule la maturation des lymphocytes B en plasmocytes. De plus, elle a un effet sur la différenciation et la croissance des cellules T. Elle agit aussi au niveau des macrophages, et d'autres types cellulaires n'appartenant pas au système immunitaire<sup>90</sup>. La souris double transgénique IL-6/sIL-6R montre une augmentation marquée du poids du foie et de la rate causée par une prolifération extramédullaire des cellules hématopoïétiques<sup>91</sup>.

LIF peut supprimer la différenciation des cellules souches embryonnaires pluripotentes et reproduit de nombreuses actions de l'IL-6<sup>90</sup>. LIF est produit par les lymphocytes T activés et l'épithélium thymique. Une déficience en LIF chez la souris entraîne une réduction du nombre de progéniteurs myéloïdes dans la rate et une défectuosité de l'activation des lymphocytes T. Par contre, l'injection de forte dose de LIF chez la souris mène à l'augmentation du nombre de mégakaryocytes spléniques et à des niveaux élevés de plaquettes<sup>92</sup>.

L'OM a été tout d'abord purifiée comme une protéine humaine pouvant inhiber la prolifération de cellules provenant de tumeurs solides<sup>93</sup>. Par la suite, il a été inclus parmi les cytokines puisqu'il est produit par des cellules hématopoïétiques et régule une variété de processus telle l'expression d'autres lymphokines (IL-6 par exemple)<sup>94</sup>. L'OM induit l'angiogénèse<sup>95</sup> et a une activité anti-inflammatoire *in vivo* sans causer d'immunosuppression<sup>12</sup>.

## ii. La souris LIF transgénique

Dans la souris LIF transgénique, dans laquelle le gène LIF est ciblé par le promoteur basal P $\mu$  (dérivé du gène de l'immunoglobuline  $\mu$  humaine), l'expression de LIF est surtout retrouvée dans les ganglions mésentériques et axillaires et dans une moindre mesure dans le thymus, la rate et les poumons. Ce patron d'expression suit de près la distribution tissulaire des lymphocytes T, en particulier les DP <sup>92</sup>.

La rate de telles souris montre une augmentation des mégakaryocytes de 2 à 3 fois ainsi qu'une prolifération des cellules stromales. L'architecture thymique est perturbée. En effet, le thymus présente une sévère atrophie corticale avec apparition de follicules B et absence marquée de DP. Les ganglions mésentériques et axillaires montrent une accumulation marquée de DP avec une architecture ganglionnaire conservée : présence de follicule B. Le nombre de lymphocytes T périphériques est réduit, en particulier les CD4 <sup>92</sup>.

Par contre, l'injection de KLH entraîne la production d'anticorps spécifiques démontrant que les souris LIF transgéniques sont capables de générer une réponse humorale <sup>92</sup>.

## **B. La souris LckOM**

### i. Le transgène

Le gène de l'OM bovin a été utilisé afin d'obtenir la souris LckOM. Celui-ci est identique à 58% avec le gène de l'OM humain et partage un grand nombre de caractéristiques avec ce dernier. Le gène bovin est capable de reconnaître le récepteur spécifique de l'OM humain. La protéine bovine est, de plus, biologiquement active et peut interagir avec les récepteurs composés de la sous-unité gp130 de l'humain et de la souris <sup>94</sup>.

La souris LckOM a été obtenue en ciblant l'expression de l'OM bovin avec le promoteur proximal du p56<sup>lck</sup>, protéine tyrosine kinase de la voie de signalisation du pré-TCR et du TCR<sup>16</sup>, dans les cellules de la lignée T en voie de développement<sup>13;94</sup>.

## ii. Les caractéristiques morphologiques

La souris LckOM est caractérisée par des changements dramatiques dans le développement des organes lymphoïdes tant primaires que secondaires<sup>94;96</sup>. Le premier fait à noter est une splénomégalie due principalement à l'accumulation de lymphocytes B<sup>14;94</sup>.

Les jeunes souris LckOM présentent une hypoplasie thymique sévère avec un très faible nombre de thymocytes immatures. La cellularité thymique augmente avec l'âge, mais ceci est causé principalement par une accumulation de lymphocytes B<sup>14</sup> et dans une moindre mesure de cellules T dans un état activé<sup>96</sup>. De plus, l'architecture thymique des souris LckOM est perturbée : la démarcation cortico-médullaire est perdue<sup>94</sup>.

La cellularité des ganglions des souris transgéniques est augmentée de 30 fois par rapport au contrôle. Ceci est dû principalement à une accumulation massive de DP dont le nombre maximal est atteint à 12 semaines<sup>14;94;96</sup>. Ces DP ont un phénotype similaire à celui de DP retrouvés dans un thymus normal<sup>96</sup>. Les ganglions LckOM présentent aussi une ségrégation entre les zones T et B, tout comme ceux d'une souris normale<sup>97;98</sup>.

## iii. Le développement T

### *Les preuves d'un développement T extrathymique*

Le transgène de l'OM cause, dans les ganglions, une accumulation dramatique de DP dont le phénotype est semblable à celui de thymocytes : Thy1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>8 $\beta$ <sup>+</sup>CD3<sup>low</sup>HSA<sup>+</sup>; et présentant un répertoire TCR V $\beta$  aussi divers que leur contre-partie thymique montrant leur origine polyclonale. À 10 semaines d'âge, la proportion des DP dans les ganglions mésentériques LckOM est de 80%, ce



qui correspond à celle d'un thymus normal. De plus, l'ARN du pT $\alpha$  a été détecté dans les ganglions transgéniques mais pas dans ceux d'une souris contrôle <sup>13</sup>. De plus, aucune accumulation notable de DP n'est observée dans les autres organes des souris LckOM <sup>14</sup>. Ceci montre que l'OM stimule le développement extrathymique des lymphocytes T dans les ganglions d'une souris transgénique.

#### *Un développement thymo-indépendant*

La reconstitution de souris B6 nude irradiées avec de la moelle osseuse LckOM déplétée en T entraîne l'apparition de cellules T en grand nombre dans les ganglions mésentériques avec plus de 75% de DP et plus de 20 % de SP CD4 ou CD8. Cette accumulation est absente lorsque les souris ont été reconstituées avec de la moelle osseuse de souris non transgénique. L'indépendance du thymus pour le développement extrathymique chez les souris LckOM a aussi été démontrée à l'aide de souris thymectomisées <sup>13</sup>.

#### *La régulation du développement T*

Des expériences de croisement entre des souris LckOM et des souris déficientes soit en IL-6, soit en IL-7R $\alpha$  ont montré que le développement T extrathymique LckOM est indépendant de l'IL-6 mais que l'interaction IL-7/IL-7R $\alpha$  est essentielle <sup>96</sup>.

Une étude histologique montre, qu'outre l'absence d'une démarcation cortico-médullaire et de cellules épithéliales, la principale caractéristique des ganglions mésentériques LckOM est une angiogénèse majeure des HEV. De plus, l'angiogénèse dépendante de COX-2 est déterminante pour le support du développement T extrathymique LckOM <sup>97;98</sup>.

Des expériences comparatives entre le thymus B6 et les ganglions LckOM montrent que l'expression de CCL20 est corrélée avec l'occurrence du développement T : les transcrits de CCL20 sont présents à la fois dans le thymus B6 et les ganglions mésentériques LckOM mais absents des ganglions B6. Par contre, des tests de compétition dans des receveurs thymectomisés et irradiés reconstitués avec un mélange 50:50 de cellules de moelle osseuse réduites en cellules T provenant de

souris CCR6<sup>+</sup> (OM<sup>+</sup>) et de souris CCR6<sup>-/-</sup> (OM<sup>-</sup>) montrent que l'interaction CCL20/CCR6 n'est pas importante pour l'initiation du développement T chez la souris LckOM<sup>97</sup>.

#### *La sélection du répertoire T*

Les analyses du développement des lymphocytes T dans des chimères hématopoïétiques ont montré que l'expression du CMH de classe I uniquement sur les cellules hématopoïétiques est suffisante pour supporter la sélection positive d'un répertoire diversifié de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> LckOM. De plus, des études effectuées avec des souris transgéniques pour un TCR donné indiquent que la sélection positive ne suit pas les mêmes règles dans le thymus que dans les ganglions LckOM : l'expression du CD5 comme marqueur de l'avidité des interactions TCR/CMH suggèrent que la hiérarchie clonotypique du TCR est différente dans les ganglions LckOM par rapport à celle du thymus B6<sup>98;99</sup>.

Par contre, la sélection négative apparaît être efficace, au moins pour les lymphocytes T portant le TCR 2C et HY<sup>98;99</sup>, malgré l'absence de la ségrégation cortico-médullaire<sup>97</sup>.

#### *Le phénotype des lymphocytes T en périphérie*

Les lymphocytes T matures présents dans la rate des souris LckOM exhibent un phénotype associé à des cellules T activées ou mémoires. En effet, les CD4 sont CD44<sup>high</sup>CD45RB<sup>low</sup>CD62L<sup>low</sup>CD122<sup>low</sup>, ce qui correspond au phénotype de lymphocytes suivant un engagement du TCR par des antigènes du soi ou étranger; les CD8 sont, pour leur part, CD44<sup>high</sup>CD45RB<sup>high</sup>CD62L<sup>high</sup>CD122<sup>high</sup>, correspondant au phénotype retrouvé sur des lymphocytes T ayant subi une prolifération homéostatique ou des lymphocytes T engagés par des antigènes du soi. Autre signe d'un état activé, le taux de prolifération des cellules T matures LckOM est plus élevé que celui des lymphocytes T naïfs B6. Par contre, le répertoire Vβ des cellules T extrathymiques est aussi diversifié que celui de leur contre-partie thymique<sup>14</sup>.

*La compétence immunitaire des souris LckOM*

Bien que peu d'étude ait été effectuée concernant l'immunocompétence des souris transgéniques, leur habilité à rejeter des tumeurs a été prouvée. En effet, dix jours après l'injection de cellules de mélanomes allogéniques, le volume de la tumeur observé chez les souris transgéniques LckOM était significativement plus faible que celui vu dans les contrôles <sup>13</sup>.

## MÉTHODOLOGIE

### *Souris*

Des souris B6.SJL-*Ptprc*<sup>a</sup>/BoAiTac (B6.SJL; Ly-5.1<sup>+</sup>) ont été achetées chez Taconic Laboratories (Germantown, NY), les souris C57BL/6J (B6; Ly-5.2<sup>+</sup>) et les souris B6.129S7-*Rag1*<sup>tm1Mom</sup> (*Rag1*<sup>-/-</sup>) chez The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Les souris transgéniques LckOM (Ly-5.2<sup>+</sup>) ont déjà été décrites<sup>13;14</sup>. Brièvement, le promoteur proximal p56<sup>lck</sup> cible l'expression du gène de l'OM bovin dans les thymocytes. Les souris ont été maintenues dans des conditions spécifiques exemptes de pathogènes (dans des portoirs ventilés et stériles dans le cas des souris LckOM) au Centre de Recherche Guy Bernier selon les standards du Conseil Canadien pour la Protection des Animaux.

### *Thymectomie et greffe de foie foetal*

À 4-5 semaines, les souris ont été anesthésiées par injection i.p. d'une solution de 75 mg/kg de pentobarbital sodique (Somnotol, MTC Pharmaceuticals, Cambridge, Ontario, Canada), et le thymus a été enlevé grâce à une canule introduite sous le creux suprasternal. La totalité de la thymectomie a été vérifiée dans chaque animal par inspection visuelle au moment du sacrifice. La greffe de foie foetal a été effectuée au moins 2 semaines après la chirurgie. Les cellules de foie foetal LckOM ont été récoltées au jour 13 *postcoitum*. Les chimères hématopoïétiques ont été créées en injectant  $2 \times 10^6$  cellules de foie foetal LckOM dans des receveurs *Rag1*<sup>-/-</sup> ou B6.SJL irradiés (10 Gy). Les cellules du receveur et du donneur ont été discriminées par cytométrie en flux en utilisant les anticorps anti-Ly5.1 (CD45.1) et anti-Ly 5.2 (CD45.2) (Pharmingen Mississauga, Canada). Les études fonctionnelles sur les chimères hématopoïétiques ont été effectuées 80 à 120 jours post-greffe.

### *Isolation des lymphocytes T*

Après déplétion des érythrocytes par choc hypotonique, les splénocytes sont lavés et resuspendus à une densité de  $1 \times 10^7$  cellules par ml dans du milieu RPMI 1640 contenant 1% de SVF. Les lymphocytes T ont été purifiés par sélection négative

des lymphocytes B en utilisant des anticorps anti-B220 liés à des microbilles (Dynal, Lake Success, NY) à un ratio de 5 billes par cellules cibles, suivie par une déplétion magnétique des billes. Les macrophages ont alors été éliminés par adhérence : les cellules ont été resuspendues à une concentration de  $1-2 \times 10^6$  cellules par ml dans du milieu RPMI 1640 contenant 10% de SVF, 2 mM de L-glutamine, 100 UI/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, et 50 µM de 2-mercaptoéthanol et incubées 90 min. en milieu humide à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. La pureté des lymphocytes T isolés a été déterminée par analyse au FACS et était de 64% ( $\pm 10\%$ ) pour les cellules de chimère et de 91% ( $\pm 1\%$ ) pour les cellules contrôles (B6).

#### *Marquage au CFSE*

Le marquage fluorescent des lymphocytes T a été effectué tel que décrit<sup>100</sup>. Brièvement, les lymphocytes T ont été resuspendus à  $5 \times 10^6$  cellules par ml dans du milieu HBSS sans Mg<sup>2+</sup> ni Ca<sup>2+</sup> préchauffé à 37°C et le carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDASE; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) dans du DMSO a été ajouté (1-2.5 µM). Les cellules ont alors été incubées 15 min. dans un bain-marie à 37°C, puis le CFDASE non-lié a été bloqué par l'addition de 10% de SVF froid. Les cellules ont alors été lavées 2 fois dans du milieu avant la mise en culture.

#### *Conditions de culture*

Les cellules marquées au CFSE ont été resuspendues à  $1 \times 10^6$  cellules par ml dans du milieu RPMI 1640 contenant 10% de SVF, 2 mM de L-glutamine, 100 UI/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, et 50 µM de 2-mercaptoéthanol et mis dans des microplaques de 96 puits à fond rond à raison de  $1 \times 10^5$  cellules par puits. L'activation des lymphocytes T a été obtenue par de l'anti-CD3 (145-2C11, Pharmingen, San Diego, CA) lié au puits avec ou sans anti-CD28 soluble (1 µg/ml; 37.51, Pharmingen) ou un anticorps contrôle (Ig de hamster; 1 µg/ml; Ha4/8, Pharmingen).

### *Analyse en cytométrie en flux*

Au moment de la récolte, les cellules marquées au CFSE ont été comptées, lavées dans du RPMI 1640, et marquées avec une combinaison d'anticorps anti-CD4 (RM4-5; Pharmingen) ou anti-CD8 (53-6.7; Pharmingen) conjugués à l'APC et l'anticorps Ly5.1 (Pharmingen) ou Ly5.2 (Pharmingen) conjugués à la biotine, suivi par de la streptavidine (Pharmingen) conjuguée au PE ou au PerCP. Les tétramers H2D<sup>b</sup>/LCMV GP33-41 ont été obtenus du NIAID MHC Tetramer Core Facility (Atlanta, GA). Les analyses de la cinétique de prolifération des lymphocytes T parmi les populations de lymphocytes T marqués au CFSE ont été effectuées sur les cellules vivantes, les cellules mortes ayant été exclues grâce au marquage au 7-amino-actinomycine D (7-AAD; Via-Probe; Pharmingen). Les calculs du temps de division (temps requis pour la moyenne des lymphocytes T répondants à effectuer une division cellulaire) et de la capacité proliférative (nombre de cellules filles générées par un précurseur T s'étant divisé) ont été effectués tel que décrit <sup>101</sup>.

Pour les tests d'apoptose, les cellules marquées ont été lavées et resuspendues dans du tampon de liaison et incubées avec de l'annexin-V (Pharmingen) conjuguée au PE pendant 15 min. à température pièce dans le noir.

Pour le marquage intracellulaire, le transport protéique a été inhibé par l'ajout de monensin (Pharmingen) 6 heures avant la récolte des cellules. Après avoir été marquées au niveau membranaire avec de l'anti-CD4 (RM4-5; Pharmingen) conjugué au PerCP et de l'anti-CD8 (53-6.7; Pharmingen) conjugué à l'APC, les cellules ont été fixées et perméabilisées avec du Cytofix/Cytoperm (Pharmingen) et marquées au niveau intracellulaire avec de l'anti-IL2 (5 µg/ml; JES6-5H4; Pharmingen) ou de l'anti-IFNγ (2.5 µg/ml; XMG1.2; Pharmingen) conjugués au PE ou leur contrôle isotypique : anti-IgI<sub>2b</sub> (5 µg/ml; A95-1; Pharmingen) et anti-IgG1 (2.5 µg/ml; R3-34; Pharmingen).

Les analyses ont été effectuées avec un cytomètre en flux FACSCalibur utilisant le logiciel CellQuest (Becton Dickinson). Les différences entre les moyennes des groupes ont été testées grâce à un test du *t* de Student.

*Immunisation avec des cellules dendritiques et essai de cytotoxicité in vivo*

L'enrichissement des cellules dendritiques spléniques a été effectué tel que décrit <sup>102</sup>. Brièvement, les rates ont été digérées avec de la collagénase D (Sigma), passées sur un filtre d'acier, resuspendues dans du RPMI 1640 complémenté avec 10% de SVF et antibiotiques et cultivées 90 min. dans des flasques. Les cellules non-adhérentes ont été éliminées et les cellules adhérentes cultivées pour la nuit dans du RPMI 1640 complémenté avec 10% de SVF et contenant 10ng/ml de GM-CSF (Sigma) et 100ng/ml d'IL-4 (Sigma). Les cellules adhérentes et de faible densité ont été récoltées. Les suspensions cellulaires préparées de cette manière contenaient 30 à 60% de cellules dendritiques CD11c<sup>+</sup>CMHII<sup>+</sup>. Les cellules dendritiques spléniques ont été resuspendues dans du milieu contenant le peptide GP33-41 à une concentration de 10<sup>-6</sup>M, incubées 60 min. à 37°C, lavées trois fois avec du RPMI 1640 et la proportion de cellules dendritiques CD11c<sup>+</sup>CMHII<sup>+</sup> a été évaluée par cytométrie en flux. La concentration cellulaire a été ajustée afin que les suspensions cellulaires utilisées pour l'immunisation intraveineuse contiennent 2 x 10<sup>6</sup> cellules dendritiques CD11c<sup>+</sup>CMHII<sup>+</sup>/ml. Les essais de cytotoxicité *in vivo* ont été effectués tel que décrit <sup>62</sup>. Brièvement, des splénocytes B6 marqués avec 10<sup>-6</sup>M de peptide GP33-41 ou non ont été colorés avec une forte (250nM) ou une faible (25nM) concentration de CFSE, respectivement. Pour l'injection intraveineuse, des nombres égaux de cellules de chacune des deux populations ont été mélangés ensemble afin que chaque souris reçoivent un total de 20 x 10<sup>6</sup> cellules. Au jour 0, les cellules marquées au CFSE ont été injectées dans des receveurs soit naïfs, soit ayant été immunisés avec les cellules dendritiques marquées de peptide aux jours -21 et -7. Les receveurs ont été sacrifiés 4h plus tard. Les formules suivantes ont été utilisées pour calculer la lyse spécifique : ratio = (pourcentage CFSE<sup>low</sup>/pourcentage CFSE<sup>high</sup>), et pourcentage de lyse spécifique = [1 - (ratio souris non-immunisée/ratio souris immunisée) X 100].

## ARTICLE

### **Do thymic and extrathymic T cells generate similar immune responses?**

Marie-Ève Blais<sup>1</sup>, Gwladys Gérard<sup>1</sup>, Marianne M. Martinic, Guillaume Roy-Proulx, Rolf M. Zinkernagel et Claude Perreault.

(<sup>1</sup> : Ces auteurs ont contribué également à cet article)

Cet article est en phase finale de préparation et sera soumis dans Journal of Experimental Medicine.

Les études de la fonction des T LckOM ont été réalisées :

- 1) par moi-même, pour toutes les expériences portant sur la fonction *in vitro* des lymphocytes T extrathymiques par rapport aux lymphocytes T d'origine thymique
- 2) par Marie-Ève, pour les études d'infection *in vivo* avec le LCMV
- 3) conjointement par Marie-Ève et moi-même, pour les immunisations *in vivo* avec les cellules dendritiques
- 4) par Marianne, pour les tests *in vivo* impliquant le VSV



Gwladys Gérard  
M.Sc. Sciences biomédicales

**Do thymic and extrathymic T cells generate similar immune responses?**

Marie-Ève Blais<sup>1</sup>, Gwladys Gérard<sup>1</sup>, Marianne M. Martinic, Guillaume Roy-Proulx,  
Rolf M. Zinkernagel et Claude Perreault.

(<sup>1</sup> : Ces auteurs ont contribué également à cet article)

Cet article est en phase finale de préparation et sera soumis dans Journal of Experimental Medicine.

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Gwladys Gérard incluse cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Étude fonctionnelle de lymphocytes T extrathymiques produits sous l'effet de l'oncostatin M.

Claude Perreault 25 avril 2003

Marie-Ève Blais 25 avril 2003

Marianne M. Martinic 25 avril 2003

Guillaume Roy-Proulx 25 avril 2003

Rolf M. Zinkernagel 25 avril 2003

# Do thymic and extrathymic T cells generate similar immune responses?

Marie-Ève Blais<sup>1,2</sup>, Gwladys Gérard<sup>1,2</sup>, Marianne M. Martinic<sup>3</sup>, Guillaume Roy-Proulx<sup>2</sup>,

Rolf M. Zinkernagel<sup>3</sup> and Claude Perreault<sup>2,4</sup>

<sup>2</sup>Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal,  
Quebec, Canada H1T 2M4

<sup>3</sup>Institute for Experimental Immunology, University Hospital,  
CH-8091 Zürich, Switzerland

Total word count:

Key words: CD4 T cells, CD8 T cells, cell differentiation, lymph nodes, viral immunity.

<sup>4</sup>Corresponding author: Claude Perreault  
Guy-Bernier Research Center  
Maisonneuve-Rosemont Hospital  
5415 de l'Assomption blvd.  
Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4  
Telephone: (514) 252-3557, Fax: (514) 252-3430  
Internet: [REDACTED]

<sup>1</sup> The first two authors contributed equally to this work.

If present in sufficient amount, could extrathymic T cells substitute for thymus-derived T cells? To address this issue, we studied extrathymic T cells that develop in athymic mice under the influence of oncostatin M. In this model, extensive T cell development takes place exclusively in the lymph nodes. Extrathymic CD4 T cells expanded poorly and were deficient in providing B cell help after infection with vesicular stomatitis virus. Compared with classic T cells, stimulated extrathymic CD8 T cells produced copious amounts of IFN- $\gamma$ , and their expansion was precocious but of limited amplitude because of a high apoptosis rate. Consequently, though extrathymic CTLs responded to lymphocytic choriomeningitis virus infection, as evidenced by the expansion of GP33-41 tetramer<sup>+</sup> CD8 T cells, they provided only short-term control of virus infection. This suggests that rapidly replicating IFN- $\gamma$ -resistant pathogens represent the nemesis of extrathymic CTLs. Our data demonstrate that the site of development impinges on T cell function: extrathymic T cells cannot substitute for thymic T cells. Co-evolution with the type of pathogens used herein may have been instrumental in the remarkable conservation of the thymus as the primary T lymphoid organ in all animals with an adaptive immune system.

*Abbreviations used in this paper:* B6, C57BL/6; B6.SJL, B6.SJL-*Ptprc<sup>a</sup>Pep3<sup>b</sup>*/BoyJ; DC, dendritic cell; LCMV, lymphocytic choriomeningitis virus; OM, Oncostatin M; TEC, thymic epithelial cell; VSV, vesicular stomatitis virus.

## Introduction

One hallmark of the gnathostome adaptive immune system is that the thymus has been conserved as the primary T lymphoid organ during 450 million years of evolution (1). This level of conservation is remarkable when one considers that about ten different organs have been used as primary sites of hematopoiesis in gnathostomes (1). Thymic epithelial cells (TEC) derived from the third pharyngeal pouch are the main constituent of the thymic environment (2). Indeed, ectopically grafted MTS24 epithelial progenitor cells are sufficient to generate a functional thymus *in vivo* (3,4). TECs provide two types of signals to thymocytes: TCR-dependent and -independent (5-7). In conjunction with mesenchymal cells, TECs have a unique ability to provide TCR-independent interactions which are essential for several thymocyte developmental events but whose nature is still elusive (2,8-11). In contrast, TCR-mediated signals, dictating which TCR clonotypes are positively selected, can be supported by MHC-peptide complexes displayed by other cell types. Thus, studies involving hematopoietic chimeras and thymus grafts have shown that hematopoietic cells located in the thymus (but not in the periphery) can mediate positive selection of CD8 T cells *in vivo* (7,12,13). In line with this, studies in tetraparental aggregation chimeras have demonstrated that the MHC of TECs is not required for efficient positive selection of MHC Ia- and MHC II-restricted T cells (14). Moreover, under normal circumstances, preferential or exclusive positive selection on hematopoietic cells appears to be a general characteristic shared by many (if not all) MHC class Ib-restricted T cells (15). Thus, positive thymocyte selection on hematopoietic cells has been well documented for CD1d-restricted CD4 NKT cells as well as H2-M3- and Qa-1-restricted CD8 T cells (15-17). Furthermore, using a two-

step *in vitro* culture system, Yasutomo *et al.* demonstrated that dendritic cells (DC) can provide TCR stimulation suitable for initiation and completion of positive selection (18). Together these data indicate that the non redundant role of TECs is to provide TCR-independent signal(s) to thymocytes but that in a suitable (thymic) environment hematopoietic cells can provide the TCR signal (7,19).

The above considerations raise the fundamental question of whether the canonical influence of thymic epithelial cells on T cell development has biological relevance: would lymphocytes developing in a TEC-free milieu be functional? Oncostatin M (OM) transgenic mice represent a unique model to directly address this issue. Remarkably, chronic exposure to OM transforms the LN into a “primary” lymphoid organ whose ability to support T cell development and to seed secondary lymphoid organs is similar to that of a normal thymus (20,21). The lymphopoietic pathway modulated by OM is truly thymus-independent and can develop, for example, in non-transgenic athymic mice injected with OM over a few weeks (20,21). Importantly, OM-induced extrathymic T cell development, as evidenced by the expression of pT $\alpha$  and the presence of all stages of T cell development, takes place only in the LNs and not in other organs such as the spleen, bone marrow, gut and liver (20,21). The proportions of double-negative, double-positive and single-positive T cells in the OM<sup>+</sup> LN reproduce those found in a thymus, and the TCR repertoire of the SP cells is diversified. The effect of OM on extrathymic T cell development in the LNs might be due to some amplification of a cryptic pathway recently characterized in nude mice (22). Like normal LNs, OM-transgenic LNs contain no epithelial cells (23). The nature of the nonepithelial cells that support positive selection of CD4 T

cells in the OM<sup>+</sup> LN has yet to be addressed. Nevertheless, studies in hematopoietic chimeras have demonstrated that MHC class I expression strictly on hematopoietic cells was sufficient to support the development of a diversified repertoire of CD8 T cells in the OM<sup>+</sup> LNs (24). While the rules governing positive selection in the OM<sup>+</sup> LN differ from those of the mainstream thymic pathway, no difference was detected with regard to negative selection (24).

In order to directly evaluate the functionality of T cells generated in an environment devoid of epithelial cells, we therefore sought to characterize *in vitro* and *in vivo* the function of extrathymic T cells that develop in the OM-conditioned LN of athymic mice. More specifically, we addressed two questions: do extrathymic T cells proliferate normally following TCR engagement, and are they able to generate protective immune responses against model viruses, lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) and vesicular stomatitis virus (VSV)?

## Materials and Methods

*Mice.* C57BL/6 (B6) mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and the Institute of Laboratory Animal Science, University of Zürich, Switzerland. B6.SJL-*Ptprc<sup>a</sup>Pep3<sup>b</sup>*/BoyJ (Ly5<sup>a</sup>) (B6.SJL; Ly 5.1<sup>+</sup>) and B6.129S7-*Rag1<sup>tm1Mom</sup>* (RAG1<sup>-/-</sup>) mice were purchased from The Jackson Laboratory. LckOM-transgenic mice on a C57BL/6 background have been previously described (21,25).

*Thymectomy and Fetal Liver Transplantation.* Thymectomy was performed as previously described (21). Fetal liver transplantation was performed at least 2 wk after thymectomy. LckOM fetal liver cells were collected on day 13 postcoitum. Hemopoietic chimeras were created by injecting intravenously  $2 \times 10^6$  LckOM fetal liver cells into irradiated (10 Gy) RAG1<sup>-/-</sup> or B6.SJL recipients. Donor and recipient cells were discriminated by flow cytometry using anti-Ly5.1 (CD45.1) and anti-Ly5.2 (CD45.2) antibodies (Pharmingen, Mississauga, Canada). Functional studies in hemopoietic chimeras were initiated 80 to 120 days after transplantation.

### *In vitro T cell stimulation*

*T-cell isolation.* After depletion of erythrocytes by hypotonic shock, splenocytes were washed and resuspended at a density of  $1 \times 10^7$  cells per ml in RPMI 1640 medium containing 1% FCS. T cells were purified by negative selection of B lymphocytes using anti-B220 bound to microbeads (Dyna, Lake Success, NY) at a concentration of 5 beads per target cells, followed by magnetic bead-depletion. Then, macrophages were removed by adherence and T cells were resuspended at a

density of  $1-2 \times 10^6$  cells per ml in RPMI 1640 medium containing 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 UI/ml of penicillin, 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin, and 50  $\mu\text{M}$  2-mercaptoethanol and incubated for 90 min in humidified 5%  $\text{CO}_2$  at  $37^\circ\text{C}$ .

*CFSE staining.* Fluorescent labeling of T-cells was performed as described (26). Briefly, T-cells were resuspended at  $5 \times 10^6$  cells per ml in prewarmed HBSS without  $\text{Mg}^{2+}$  nor  $\text{Ca}^{2+}$  and carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDASE; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) in DMSO was added (1-2.5  $\mu\text{M}$ ). Cells were gently mixed for 15 min at  $37^\circ\text{C}$ , and unbound CFDASE was quenched by the addition of 10% ice-cold FCS. Labeled cells were washed twice in medium before culture.

*Culture conditions.* CFSE-labeled cells were resuspended at  $1 \times 10^6$  cells per ml in RPMI medium containing 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 UI/ml of penicillin, 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin, and 50  $\mu\text{M}$  2-mercaptoethanol and plated at  $1 \times 10^5$  cells per well in round-bottom 96-well microtiter plates. T cell activation was achieved by coated anti-CD3 (145-2C11, Pharmingen) with or without soluble anti-CD28 (1  $\mu\text{g/ml}$ ; 37.51, Pharmingen) or control hamster Ig (1  $\mu\text{g/ml}$ ; Ha4/8, Pharmingen). At the time of harvest, CFSE-labeled cells were counted, washed in RPMI 1640, and stained with a combination of antibodies before analysis. The doubling time (the time required for the average responding T cell to achieve a single cell division) and the proliferative burst size (the number of daughter cells generated by a dividing T cell "precursor") were calculated as described (27). For intracellular cytokine staining, cells were restimulated with PMA (20 ng/ml; Sigma, St. Louis,



MO) and ionomycin (750 ng/ml; Sigma) 4 h prior to cell harvesting and monensin (Pharmingen) was added one hour later.

### *Viruses.*

*LCMV infection and viral titers.* LCMV-ARM was originally obtained from Dr. M. Buchmeier (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA), and was propagated on L929 fibroblast cells. Mice were infected by intravenous injection of 200 pfu of LCMV-ARM and viral titers in different organs were determined as described with the immunological focus assay (28-31).

*VSV neutralization assay.* Serum of mice immunized intravenously with  $2 \times 10^6$  pfu of VSV-IND was prediluted 40-fold in MEM containing 2% FCS. Serial twofold dilutions were mixed with equal volumes of VSV (500 pfu/ml) and incubated for 90 min at 37°C in an atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. 100 µl of the serum-virus mixture was transferred onto Vero cell monolayers in 96-well plates and incubated for 1 h at 37°C. The monolayers were overlaid with 100 µl DMEM containing 1% methylcellulose and incubated for 24 h at 37°C. The overlay was flicked off and the monolayer was fixed and stained with 0.5% crystal violet. The highest dilution of serum that reduced the number of plaques by 50% was taken as titer. To determine IgG titers, undiluted serum was pretreated with an equal volume of 0.1 mM β-ME in saline (32,33).

*Flow cytometric analysis.* The following monoclonal antibodies were used for phenotypic analysis: PerCP- or APC-conjugated anti-CD4 (RM4-5; Pharmingen), APC-conjugated anti-CD8 (53-6.7; Pharmingen), biotin-conjugated anti-Ly5.1

(Pharmingen) or anti-Ly5.2 (Pharmingen), and PE- or PerCP-conjugated streptavidin (Pharmingen). H2D<sup>b</sup>/LCMV GP33-41 tetramers and H2D<sup>b</sup>/B6<sup>dom1</sup> tetramers (34,35) were obtained from the NIAID MHC Tetramer Core Facility (Atlanta, GA) and CANVAC Tetramer Core Facility (Montreal, Canada), respectively. Kinetic analyses of T cell proliferation in populations of CFSE-labeled T cells were performed on live cells, dead cells being excluded on the basis of 7-amino-actinomycin D (7-AAD; Via-Probe; Pharmingen) staining. Intracellular cytokine staining for IL-2 and IFN- $\gamma$  was performed according to the manufacturer's instructions (Pharmingen). For estimation of apoptotic cells, stained cells were washed and resuspended in binding buffer and incubated with PE- or FITC-conjugated annexin-V (Pharmingen) for 15 min at room temperature in the dark. Analyses were performed with a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest software (Becton Dickinson). Differences between group means were tested using Student's *t* test.

*Immunization with DCs and in vivo CTL assay.* Enrichment for splenic DCs was performed as described (36). Briefly, spleens were digested with collagenase D (Sigma), ground through a stainless steel screen, resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS and antibiotics and cultured in tissue culture dishes for 90 min. Nonadherent cells were removed and adherent cells were cultured overnight in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 10 ng of GM-CSF (Sigma) per ml and 100 ng of IL-4 (Sigma) per ml. Nonadherent, low-density cells were harvested. Cells suspensions prepared in this way contained 30 to 60% CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> DCs. Spleen DCs were resuspended in medium containing GP33-41 at a concentration of 10<sup>-6</sup> M, incubated for 60 min at 37°C, washed three times with RPMI 1640, and the

proportion of CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> DCs was assessed by flow cytometry. The cell concentration was adjusted so that the cell suspension used for intravenous immunization contained  $2 \times 10^6$  CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> DCs per ml. *In vivo* CTL assay was performed as described by Coles *et al.* (37). Briefly, B6 splenocytes pulsed with  $10^{-6}$  M GP33-41 peptide or not were labeled with a high (250 nM) and low (25 nM) concentration of CFSE, respectively. For intravenous injection, equal numbers of cells from each population were mixed together such that each mouse received a total of  $20 \times 10^6$  cells. On day 0, CFSE labeled cells were injected into recipients that were naïve or had been previously injected with peptide pulsed DCs on days -21 and -7. Recipients were sacrificed 4 h later. The following formula was used to calculate specific lysis: ratio = (percentage CFSE<sup>low</sup>/percentage CFSE<sup>high</sup>), and percentage specific lysis =  $[1 - (\text{ratio unprimed}/\text{ratio primed}) \times 100]$ .

## Results

### *In vitro function of T lymphocytes of thymic vs. extrathymic origin.*

*Proliferation.* We first asked whether T cells of extrathymic origin, that is, which developed in the LN under the influence of OM, would have the same proliferative behavior as classic T cells of thymic origin following stimulation with anti-CD3  $\pm$  anti-CD28. Spleen T cells from B6 mice (thymic T cells) and from irradiated (10 Gy) adult-thymectomized B6.SJL (Ly5.1) hosts reconstituted with LckOM fetal liver cells (Ly5.2; extrathymic T cells) were labeled with CFSE and cultured in CD3-coated microtiter plates in the presence or not of soluble anti-CD28. After culturing for 24 to 96 h, cells were labeled with 7-AAD to exclude necrotic cells, and stained with antibodies against CD4, CD8, Ly5.1 and Ly5.2. At all time points after stimulation more than 99% of harvested T lymphocytes were Ly5.1<sup>-</sup> Ly5.2<sup>+</sup> (data not shown).

From one representative experiment Fig. 1A shows the absolute numbers of CD4 and CD8 T cells recovered after stimulation for 24 to 96 h, and their CFSE content which decreases by 50% after each cell division. The numbers of CD4 and CD8 T cells harvested at 48 to 96 h were expressed as a function of X which represents the number of cells/well at 24 h (before the beginning of cell division). Calculation of the proliferative burst size and the doubling time were based on the results of five consecutive experiments (Fig. 1B). The proliferative burst size corresponds to the number of daughter cells generated by a dividing T cell

“precursor”, and the doubling time represents the time required for the average responding T cell to achieve a single cell division (27).

As expected, proliferation of thymic T cells was more rapid in the presence of co-stimulation with anti-CD28 than when stimulated with anti-CD3 alone. Furthermore, expansion of thymic CD8 T cells was more rapid and extensive than for CD4 T cells following stimulation with anti-CD3  $\pm$  anti-CD28. This observation is consistent with recent reports that, both *in vivo* and *in vitro*, CD8 T cells are programmed to undergo more rapid and extensive proliferation than CD4 T cells in response to antigen stimulation (38,39). When compared to their thymic counterparts, extrathymic CD4 T cells showed an increased burst size when stimulated with anti-CD3 alone but not when anti-CD28 was added. Of note, in the presence of anti-CD3  $\pm$  anti-CD28, total accumulation of extrathymic CD4 T cells at 72 h was decreased by ~50% relative to thymic T cells (Fig. 1B). When stimulated with anti-CD3  $\pm$  anti-CD28, extrathymic CD8 T cells proliferated more rapidly and showed a greater burst size than thymic T cells. However, although extrathymic T cells accumulated to higher levels than thymic CD8 T cells when stimulated with anti-CD3 alone, their expansion, in contrast to thymic T cells, was barely augmented by co-stimulation with anti-CD28. Thus, altogether, extrathymic T cells divided more rapidly and extensively than thymic T cells. However, a discrepancy emerged between the doubling time and burst size on one side and total cell accumulation of extrathymic T cells on the other side. This discrepancy suggested that accumulation of extrathymic T cells following TCR engagement might be curtailed by an increased apoptosis rate.

*Apoptosis.* To evaluate the apoptosis rate, T cells were labeled with Annexin V at the time of harvest. The results showed that at all time points after stimulation with anti-CD3  $\pm$  anti-CD28, the apoptosis rate was much greater for extrathymic than for thymic CD4 and CD8 T cells (Fig. 2A). Analysis of Annexin V staining of T cells as a function of their CFSE content revealed that the difference between thymic and extrathymic T cells prevailed irrespective of whether they had gone through 0 to  $>6$  cell divisions after stimulation (Fig. 2B). Therefore, the higher apoptosis rate of extrathymic CD4 and CD8 T cells was a constant finding which was not due to their more rapid post-triggering proliferation rate.

*Cytokine production.* We next asked whether the brisk proliferative response of extrathymic T cells was coupled with a more rapid cytokine production. IL-2 and IFN- $\gamma$  production was assessed by intracellular staining in thymic and extrathymic T cells stimulated with anti-CD3  $\pm$  anti-CD28 (Fig. 2C). Only minor yet reproducible differences were found between thymic and extrathymic T cells as regards IL-2 production. The proportion of IL-2 producing CD8 T cells was greater among extrathymic than thymic T cells. Yet, more thymic than extrathymic CD4 T cells produced IL-2 when stimulated with anti-CD3  $\pm$  anti-CD28. The salient finding was the difference in IFN- $\gamma$  production. The proportion of IFN- $\gamma^+$  T cells was increased about twofold in extrathymic relative to thymic CD4 and CD8 T cells and the level of intracellular IFN- $\gamma^+$  was dramatically increased in extrathymic CD8 T cells.

*In vivo responses against viruses.*

We assessed *in vivo* responses of extrathymic T cells against two model viruses, LCMV and VSV. Initial control of LCMV, a noncytopathic virus, is mainly dependent on CD8 CTLs (40,41) whereas long-term virus control requires B cells and CD4 T cells (28,42). VSV, a cytolytic virus, is eliminated by early produced neutralizing IgM (T-independent) followed by IgG (CD4-dependent) antibodies against VSV glycoprotein (43,44). In order to study animals in which 100% of T cells were of extrathymic origin, we transplanted thymectomized-irradiated RAG1<sup>-/-</sup> mice with LckOM fetal liver (OM→RAG1<sup>-/-</sup> chimeras), and infected them with LCMV or VSV approximately 90 days later.

*CD8 response against LCMV.* Following infection with LCMV-ARM (200 pfu intravenously), the kinetics of anti-LCMV CD8 response was assessed with H2D<sup>b</sup>/GP33-41 tetramers and its efficacy in terms of virus clearance was estimated with the immunological focus assay (31). The proportion of tetramer<sup>+</sup> CD8 splenocytes increased more rapidly in OM→RAG1<sup>-/-</sup> chimeras (~12% on day 3) than in B6 controls (~4% on day 3) (Fig. 3A). Tetramer<sup>+</sup> CD8 cells in chimeras were genuine GP33-41 specific T cells since they were CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11c<sup>-</sup>, and did not show nonspecific binding of H2D<sup>b</sup>/B6<sup>dom1</sup> tetramers (data not shown). The rapid expansion of extrathymic tetramer<sup>+</sup> CD8 T cells is in keeping with what we observed following *in vitro* stimulation (Fig. 1). Is this rapid expansion cell autonomous (that is, related to some intrinsic feature of extrathymic CD8 T cells) or due to some helper effect of OM? To discriminate between these two possibilities, we created

OM→B6.SJL chimeras by transplantation of LckOM fetal liver into adult-thymectomized-irradiated B6.SJL mice. When studied on day 90 posttransplant, before LCMV-ARM infection, these mice presented a mixed lymphoid chimerism: ~95% T cells were donor-derived extrathymic T cells (Ly5.2<sup>+</sup>) while ~5% were residual host T cells (Ly5.1<sup>+</sup>) (data not shown). Donor and recipient T cells were exposed to the same levels of OM in these chimeras since OM mediates its effects in a paracrine fashion (21). Nevertheless, following LCMV-ARM infection, the two T cell populations behave differently. Again, extrathymic T cells accumulation (Ly5.2<sup>+</sup>) peaked on day 3, while host thymus-derived T cells (Ly5.1<sup>+</sup>) expanded at a slower pace (Fig. 3B) like control thymus-derived T cells (compare B6 mice in Fig. 3A). Thus, the ability of extrathymic T cells to expand more rapidly than classical T cells following LCMV-ARM infection is cell autonomous.

In OM→RAG1<sup>-/-</sup> chimeras the pool size of single-positive T lymphocytes is significantly increased in the LNs but decreased in the spleen. Furthermore, when injected in OM<sup>+</sup> mice, T cells with a naïve or a memory phenotype preferentially home to the LN rather than to the spleen (21). In line with this, we found that following LCMV-ARM infection, activated extrathymic CD8 effector T cells accumulated preferentially in the LNs. Indeed, estimates of absolute numbers of tetramer<sup>+</sup> T cells showed that while tetramer<sup>+</sup> T cells accumulated to higher levels in the spleen of B6 mice, they were more numerous in the LN of OM→RAG1<sup>-/-</sup> chimeras (Fig. 3C-D; note that only the mesenteric LNs were taken into account for estimating absolute numbers of tetramer<sup>+</sup> cells). The fact that T cells mainly



accumulate in the LNs rather than the spleen in OM<sup>+</sup> mice should have no influence on virus clearance because previous studies in Hox11<sup>-/-</sup> mice have shown that spleenless mice have normal T cell anti-virus responses (45).

Antigen driven T cell expansion is not synonymous with protective immunity. Indeed, antigen specific CD8 T cells may expand considerably *in vivo* yet show defective effector activity (46,47). Viral titers were similar in OM→RAG1<sup>-/-</sup> chimeras and B6 controls up to day 15 (Fig. 4). On day 15, LCMV was practically undetectable in OM→RAG1<sup>-/-</sup> chimeras and B6 mice, while viral titers were very high in RAG1<sup>-/-</sup> controls. By day 30 however, viral titers were increasing in the lymphoid organs, though not the lung, of OM→RAG1<sup>-/-</sup> chimeras. Thus, extrathymic T cells provided only a short-lived control of LCMV-ARM infection. The upsurge of viral replication on day 30 (Fig. 4) was suggestive of CD8 exhaustion (29), which would be consistent with the high apoptosis rate of extrathymic T cells observed following *in vitro* TCR ligation (Fig. 2). This prompted us to evaluate T cell apoptosis following LCMV-ARM infection. Notably, the proportion of apoptotic cells (Annexin V<sup>+</sup>) was increased in extrathymic (~9.9%) relative to thymic (~2.1%) CD8 T on day 0, that is under steady state conditions prior to infection ( $p < 0.05$ ; Fig. 5A). This is consistent with the high turnover of extrathymic T cells in BrdU labeling experiments (21). As expected, following infection the proportion of Annexin V<sup>+</sup> cells in B6 mice and OM→RAG1<sup>-/-</sup> chimeras was greater among tetramer<sup>+</sup> than tetramer<sup>-</sup> CD8 T cells (Fig. 5A). Thus, in the same manner as thymic T cells, apoptosis of extrathymic T cells was specific primarily to LCMV responsive T cells rather than being a TCR-

independent bystander event. Nevertheless, the key finding was that the apoptosis rate was significantly increased in extrathymic relative to control tetramer<sup>+</sup> CD8 T cells. The difference was most dramatic on day 3 ( $p < 0.0001$ ). Thus, following *in vitro* and *in vivo* stimulation, extrathymic T cells proliferate quickly, but their accumulation is limited by a high rate of apoptosis.

Infections with pathogens such as LCMV cause a massive depletion of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells and thus a significant, though usually transient, immunodeficiency (48). A growing body of evidence indicates that cytokines, particularly TNF- $\alpha$ , produced during the course of immune responses are largely responsible for the depletion of T cell progenitors (48-50). Nevertheless, under normal circumstances, T cell progenitors are largely secluded from “peripheral messages” since the blood/thymus barrier restricts entry of peripheral cells and molecules into the thymus cortex. In contrast, extrathymic T cells that develop in LNs are exposed to the high levels of cytokines generated in a secondary lymphoid organ during infection. We therefore estimated the number of double-positive T cells in the thymus of B6 mice and the mesenteric LN of OM $\rightarrow$ RAG1<sup>-/-</sup> chimeras following LCMV infection. Consistent with the above conjecture, the depletion of double-positive T cells was much more rapid and profound in the case of extrathymic T cell progenitors (Fig. 5B).

*CTL response against LCMV GP33-41-coated DCs.* As a noncytopathic virus, LCMV replicates very rapidly. We therefore assessed whether or not the use of a

nonreplicative antigen would decrease the disparity between extrathymic and thymus derived CD8 T cells. We immunized OM→RAG1<sup>-/-</sup> chimeras and control mice with GP33-41 coated DCs on day 0 and 14, and assessed *in vivo* CTL cytotoxicity against GP33-41 coated cells on day 21. *In vivo* CTL assays were performed as described by Coles *et al* (37): naïve and immunized mice were injected with a mixture of uncoated (CFSE<sup>low</sup>) and GP33-41 coated (CFSE<sup>high</sup>) splenocytes, and after 4 h specific lysis was estimated from the numbers of CFSE<sup>low</sup> and CFSE<sup>high</sup> cells in the spleen and mesenteric LN. Under these conditions, GP33-41-specific CTL activity was generated in the absence of CD4 help. Extrathymic (chimeras') T cells showed deficient GP33-41-specific cytotoxicity (Fig. 6). As observed following LCMV infection (Fig. 3), extrathymic tetramer<sup>+</sup> T cells accumulated mainly in the LNs following priming with peptide-coated DCs (Fig. 6B). The paucity of extrathymic tetramer<sup>+</sup> T cells in chimeras' spleen was sufficient to account for the low CTL activity in this organ. In contrast, accumulation of tetramer<sup>+</sup> T cells in the LN was similar for thymic and extrathymic T cells. Hence, that killing of GP33-41 coated targets by extrathymic LN T cells was deficient indicates that, on a per cell basis, extrathymic tetramer<sup>+</sup> T cells displayed low cytotoxicity. Coupled with their high propensity to apoptosis following TCR triggering (Figs. 2A,B and 5A), the low cytotoxic activity of extrathymic T cells (Fig. 6) suggest that these T cells are unduly susceptible to functional exhaustion and activation induced cell death (29,51).

*Antibody production against LCMV and VSV.* To evaluate the functionality of CD4 extrathymic T cells, we assessed their ability to help B cells for production of neutralizing Ab against VSV. The salient point was that the levels of IgG Ab

produced from day 8 onward were deficient in chimeras (Fig. 7D,E). Of note, the early CD4-independent production of neutralizing anti-VSV IgM Ab was, however, unimpaired (day 4, Fig. 7E). Thus, extrathymic CD4 T cells are defective in providing help to B cells. This defect is of particular significance when confronted with a cytopathic virus, and 2 of 3 chimeras infected with VSV died on day 10.

## Discussion

Athymic mice reconstituted with OM-transgenic hematopoietic stem cells provide a unique model for unravelling the properties of T cells generated extrathymically in an environment devoid of epithelial cells. A main conclusion of this work is that OM<sup>+</sup> extrathymic T cells do not behave like classic thymic T cells following antigen stimulation. Extrathymic CD4 T cells responded to *in vitro* stimulation with anti-CD3 ± CD28. However, because of their high apoptosis rate, OM<sup>+</sup> CD4 T cells failed to accumulate to normal levels *in vitro* despite their normal doubling time and burst size (Figs. 1 and 2). In line with this, they did not provide adequate help to B cells when mice were infected with VSV. Thus, extrathymic CD4 T cells are functionally deficient. The functionality of extrathymic CD8 T cells was superior to that of their CD4 counterpart. *In vitro* they proliferated extensively and produced greater quantities of IFN- $\gamma$  than thymus-derived T cells (Figs. 1 and 2). Under these conditions, their accumulation in 96-h culture assays was nevertheless not commensurate with their proliferative activity because it was curtailed by a high apoptosis rate. Initial control of LCMV infection is well-suited to evaluate CD8 T cell autonomous function *in vivo* since it is essentially mediated by CTLs whose expansion is CD4-independent. Interestingly, extrathymic CD8 T cells specific for the GP33-41 epitope expanded (Fig. 3) and developed low but significant cytotoxic activity following *in vivo* stimulation (Fig. 6). However, though LCMV-ARM titers were similar in chimeras and controls up to day 15, control of LCMV-ARM was ephemeral since viral replication became evident by day 30. This was explained by

the propensity of extrathymic T cells to undergo premature functional exhaustion (Fig. 6) and activation-induced apoptosis (Fig. 2A,B and 5A) following TCR triggering.

In spite of their heightened propensity to apoptosis, extrathymic CD8 T cells present interesting functional attributes. Their strengths are the celerity with which they undergo proliferation (Fig. 1 and 3) and the high quantity of IFN- $\gamma$  they produce (Fig. 2). In view of these features, it seems logical that LCMV and VSV would represent the nemesis of extrathymic CD8 T cells. Like many (but not all) viruses LCMV and VSV are relatively resistant to IFN- $\gamma$  (as opposed to type I interferon produced by infected cells), and because of their extensive replication they effectively induce T cell apoptosis (29,52). Nevertheless, extrathymic CD8 T cells were able to provide short-term protection against LCMV. As a corollary, extrathymic CD8 T cells should be more efficient against targets that are sensitive to IFN- $\gamma$  such as tumor cells, intracellular bacteria, parasites and some viruses (53,54). This assumption is consistent with two series of observations: i) OM<sup>+</sup> extrathymic T cells can eradicate a lethal inoculum of allogeneic tumor cells (20); and ii) MHC Ib-restricted CD8 T cells which share critical features with OM<sup>+</sup> CD8 T cells (see below) are effective against *Listeria monocytogenes* (55). Finally, even though we have demonstrated that extrathymic T cells are insufficient to permanently eradicate viruses, their brisk expansion and production of IFN- $\gamma$  could help classical T cells to eliminate pathogens. Indeed, under normal circumstances, CD8 T cells with an activated/memory phenotype (akin to extrathymic T cells) are responsible for the

early (~day 4) production of IFN- $\gamma$  following infection which occurs before prior to maximal CD8 T cell expansion (~day 8) and is important for initial control of infection (56-58). Evidence suggests that the early burst of IFN- $\gamma$  is produced by MHC Ib-restricted CD8 T cells (56). OM<sup>+</sup> extrathymic T cells are remarkably similar to MHC Ib-restricted T cells since they differ from classic MHC Ia-restricted T cells in the following ways: they display an activated phenotype even in uninfected animals; they initiate expansion and production of IFN- $\gamma$  more rapidly, yet accumulate to lower levels than mainstream CD8 T cells following infection (15,55,59,60). Notably, while MHC Ib-restricted T cells could generate protective response against (IFN- $\gamma$  sensitive) *Listeria monocytogenes*, they failed, like OM<sup>+</sup> CD8 T cells, to eradicate LCMV (55,60). Interestingly, both T cell populations are positively selected by hematopoietic cells, in the thymus for MHC Ib-restricted T cells and in the LN for OM<sup>+</sup> extrathymic T cells (15,24). Their activated phenotype in naïve mice suggests that these T cells have undergone high avidity interactions with cells presenting self antigens during positive selection at the DP stage and/or during peripheral expansion at the SP stage. Whether and how the nature of the cells supporting positive selection might influence T cell properties will need to be addressed in further studies.

Since T lymphocytes have a finite lifespan (of about 6 months in mouse), decreased thymus output associated with ageing and disease leads to a major restriction of the diversity of the T cell repertoire (61,62). Thus, in human subjects aged 20 to 30 years, the long-lived memory repertoire, as opposed to the naïve

repertoire, contributes less than 1% of the total diversity (63). Several observations suggest that immune competence has a major influence on lifespan, and that changes in T lymphocyte populations could be implicated in the age-related increase in incidence of infections, cancer, and autoimmune diseases (62,64,65). Therefore, strategies to rejuvenate the thymus or to create thymus substitutes are being pursued with intense interest (66-69). That OM<sup>+</sup> extrathymic T cells cannot substitute for thymic T cells even though they have a diversified TCR repertoire implies that having the ability to generate new T cells is not sufficient to ensure immunocompetence. As a corollary, our studies illustrate that immunocompetence is best assessed by confrontation with pathogens. Indeed, based solely on the ability to reject allogeneic cells, OM<sup>+</sup> extrathymic T cells seemed to be perfectly normal (20).

The functioning of the gnathostome T cell system has largely been shaped by interactions with viruses (70). Our demonstration that one crucial limitation of extrathymic T cells is their difficulty in dealing with viruses would be consistent with the idea that co-evolution with viruses has been a driving force in the remarkable conservation of the thymus as the primary T lymphoid organ in all gnathostomes. Interestingly, our work demonstrates that OM<sup>+</sup> extrathymic T cells share the phenotype and functional properties of a minor subset of T cells found in euthymic mice, MHC Ib-restricted T cells. Similar to MHC Ib-restricted T cells (15), the behavior of OM<sup>+</sup> T cells seems to fit somewhere between conventional T cells and their evolutionary precursors, NK T cells. One fascinating issue will be to determine how the environment where they develop can impinge so deeply on the function of T lymphocytes. Moreover, further studies will be needed to determine whether OM<sup>+</sup>



extrathymic T cells show the same behaviour as MHC Ib-restricted T cells against various pathogens. If this was the case, modulation of the OM-induced extrathymic development pathway may not substitute for classical thymic T cells but could have interesting therapeutic potential. Indeed, the brisk expansion and production of IFN- $\gamma$  by extrathymic T cells might be used to increase MHC-restricted antigen presentation, polarize Ag-primed CD4 T cells toward becoming Th1 cells, and eradicate IFN- $\gamma$  sensitive targets.

**Acknowledgements**

We are indebted to the NIAID MHC Tetramer Core Facility and CANVAC Tetramer Core Facility for providing tetramers. We thank Nathalie Labrecque for insightful comments and J.A. Kashul for editorial assistance. We are also grateful to Sylvie Brochu and Caroline Côté for helpful discussions and technical assistance. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research.

## REFERENCES

1. Zapata,A. and C.T.Amemiya. 2000. Phylogeny of lower vertebrates and their immunological structures. *Curr.Top.Microbiol.Immunol* 248:67-107.
2. Anderson,G., N.C.Moore, J.J.Owen, and E.J.Jenkinson. 1996. Cellular interactions in thymocyte development. *Annu.Rev.Immunol.* 14:73-99.
3. Gill,J., M.Malin, G.A.Hollander, and R.Boyd. 2002. Generation of a complete thymic microenvironment by MTS24<sup>+</sup> thymic epithelial cells. *Nat.Immunol.* 3:635-642.
4. Bennett,A.R., A.Farley, N.F.Blair, J.Gordon, L.Sharp, and C.C.Blackburn. 2002. Identification and characterization of thymic epithelial progenitor cells. *Immunity* 16:803-814.
5. Anderson,G., B.C.Harman, K.J.Hare, and E.J.Jenkinson. 2000. Microenvironmental regulation of T cell development in the thymus. *Semin.Immunol.* 12:457-464.
6. Anderson,G. and E.J.Jenkinson. 2001. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nature Rev.Immunol.* 1:31-40.
7. Zinkernagel,R.M. and A.Althage. 1999. On the role of thymic epithelium vs. bone marrow-derived cells in repertoire selection of T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:8092-8097.

8. Anderson,G., E.J.Jenkinson, N.C.Moore, and J.J.Owen. 1993. MHC class II-positive epithelium and mesenchyme cells are both required for T-cell development in the thymus. *Nature* 362:70-73.
9. Suniara,R.K., E.J.Jenkinson, and J.J.T.Owen. 2000. An essential role for thymic mesenchyme in early T cell development. *J.Exp.Med.* 191:1051-1056.
10. Anderson,G., K.J.Hare, and E.J.Jenkinson. 1999. Positive selection of thymocytes: the long and winding road. *Immunol.Today* 20:463-468.
11. Carlyle,J.R. and J.C.Zuniga-Pflücker. 1998. Requirement for the thymus in  $\alpha\beta$  T lymphocyte lineage commitment. *Immunity* 9:187-197.
12. Zinkernagel,R.M., A.Althage, E.Waterfield, B.Kindred, R.M.Welsh, G.Callahan, and P.Pincetl. 1980. Restriction specificities, alloreactivity, and allotolerance expressed by T cells from nude mice reconstituted with H-2-compatible or -incompatible thymus grafts. *J.Exp.Med.* 151:376-399.
13. Zerrahn,J., A.Volkmann, M.C.Coles, W.Held, F.A.Lemonnier, and D.H.Raulet. 1999. Class I molecules on hematopoietic cells can support intrathymic positive selection of T cell receptor transgenic T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:11470-11475.
14. Martinic,M.M., T.Rulicke, A.Althage, B.Odermatt, M.Hochli, A.Lamarre, T.Dumrese, D.E.Speiser, D.Kyburz, H.Hengartner, and R.M.Zinkernagel. 2003. Efficient T cell repertoire selection in tetraparental chimeric mice

independent of thymic epithelial MHC. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:1861-1866.

15. Urdahl,K.B., J.C.Sun, and M.J.Bevan. 2002. Positive selection of MHC class Ib restricted CD8<sup>+</sup> T cells on hematopoietic cells. *Nat.Immunol.* 3:772-779.
16. Coles,M.C. and D.H.Raulet. 2000. NK1.1<sup>+</sup> T cells in the liver arise in the thymus and are selected by interactions with class I molecules on CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells. *J.Immunol.* 164:2412-2418.
17. Sullivan,B.A., P.Kraj, D.A.Weber, L.Ignatowicz, and P.E.Jensen. 2002. Positive selection of a Qa-1-restricted T cell receptor with specificity for insulin. *Immunity* 17:95-105.
18. Yasutomo,K., B.Lucas, and R.N.Germain. 2000. TCR signaling for initiation and completion of thymocyte positive selection has distinct requirements for ligand quality and presenting cell type. *J.Immunol.* 165:3015-3022.
19. Zinkernagel,R.M. 2002. Uncertainties - discrepancies in immunology. *Immunol.Rev.* 185:103-125.
20. Clegg,C.H., J.T.Rulffes, P.M.Wallace, and H.S.Haugen. 1996. Regulation of an extrathymic T-cell development pathway by oncostatin M. *Nature* 384:261-263.

21. Boileau,C., M.Houde, G.Dulude, C.H.Clegg, and C.Perreault. 2000. Regulation of extrathymic T cell development and turnover by Oncostatin M. *J.Immunol.* 164:5713-5720.
22. Guy-Grand,D., O.Azogui, S.Celli, S.Darche, M.C.Nussenzweig, P.Kourilsky, and P.Vassalli. 2003. Extrathymic T cell lymphopoiesis: Ontogeny and contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice. *J.Exp.Med.* 197:333-341.
23. Louis,I., G.Dulude, S. Corneau, S.Brochu, C.Boileau, C.Meunier, C.Côté, N.Labrecque, and C.Perreault. 2003. Changes in the lymph node microenvironment induced by Oncostatin M. *Blood* in press.
24. Terra,R., N.Labrecque, and C.Perreault. 2002. Thymic and extrathymic T cell development pathways follow different rules. *J.Immunol.* 169:684-692.
25. Clegg,C.H., H.S.Haugen, J.T.Rulffes, S.L.Friend, and A.G.Farr. 1999. Oncostatin M transforms lymphoid tissue function in transgenic mice by stimulating lymph node T-cell development and thymus autoantibody production. *Exp.Hematol.* 27:712-725.
26. Lyons,A.B. and C.R.Parish. 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 171:131-137.
27. Gudmundsdottir,H., A.D.Wells, and L.A.Turka. 1999. Dynamics and requirements of T cell clonal expansion *in vivo* at the single-cell level:

- effector function is linked to proliferative capacity. *J.Immunol.* 162:5212-5223.
28. Planz,O., S.Ehl, E.Furrer, E.Horvath, M.A.Brundler, H.Hengartner, and R.M.Zinkernagel. 1997. A critical role for neutralizing-antibody-producing B cells, CD4<sup>+</sup> T cells, and interferons in persistent and acute infections of mice with lymphocytic choriomeningitis virus: implications for adoptive immunotherapy of virus carriers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:6874-6879.
  29. Gallimore,A., A.Glithero, A.Godkin, A.C.Tissot, Pl, T.Elliott, H.Hengartner, and R.Zinkernagel. 1998. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J.Exp.Med.* 187:1383-1393.
  30. Ochsenbein,A.F., D.D.Pinschewer, B.Odermatt, M.C.Carroll, H.Hengartner, and R.M.Zinkernagel. 1999. Protective T cell-independent antiviral antibody responses are dependent on complement. *J.Exp.Med.* 190:1165-1174.
  31. Battegay,M., S.Cooper, A.Althage, J.Banziger, H.Hengartner, and R.M.Zinkernagel. 1991. Quantification of lymphocytic choriomeningitis virus with an immunological focus assay in 24- or 96-well plates [published errata appears in J Virol Methods 1991 Nov;35(1):115 and 1992 Aug;38(2):263]. *J.Virol.Methods* 33:191-198.

32. Ochsenbein, A.F., D.D. Pinschewer, B. Odermatt, A. Ciurea, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 2000. Correlation of T cell independence of antibody responses with antigen dose reaching secondary lymphoid organs: implications for splenectomized patients and vaccine design. *J. Immunol.* 164:6296-6302.
33. Charan, S. and R.M. Zinkernagel. 1986. Antibody mediated suppression of secondary IgM response in nude mice against vesicular stomatitis virus. *J. Immunol.* 136:3057-3061.
34. Fontaine, P., G. Roy-Proulx, L. Knafo, C. Baron, D.C. Roy, and C. Perreault. 2001. Adoptive transfer of T lymphocytes targeted to a single immunodominant minor histocompatibility antigen eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat. Med.* 7:789-794.
35. McBride, K., C. Baron, S. Picard, S. Martin, D. Boismenu, A. Bell, J. Bergeron, and C. Perreault. 2002. The model B6<sup>dom1</sup> minor histocompatibility antigen is encoded by a mouse homolog of the yeast *STT3* gene. *Immunogenetics* 54:562-569.
36. Ludwig, B., S. Ehl, U. Karrer, B. Odermatt, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1998. Dendritic cells efficiently induce protective antiviral immunity. *J. Virol.* 72:3812-3818.



37. Coles, R.M., S.N. Mueller, W.R. Heath, F.R. Carbone, and A.G. Brooks. 2002. Progression of armed CTL from draining lymph node to spleen shortly after localized infection with herpes simplex virus 1. *J Immunol* 168:834-838.
38. Homann, D., L. Teyton, and M.B.A. Oldstone. 2001. Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8<sup>+</sup> but declining CD4<sup>+</sup> T-cell memory. *Nat. Med.* 7:913-919.
39. Foulds, K.E., L.A. Zenewicz, D.J. Shedlock, J. Jiang, A.E. Troy, and H. Shen. 2002. CD4 and CD8 T cells are intrinsically different in their proliferative responses. *J Immunol* 168:1528-1532.
40. Zinkernagel, R.M. and R.M. Welsh. 1976. H-2 compatibility requirement for virus-specific T cell-mediated effector functions in vivo. I. Specificity of T cells conferring antiviral protection against lymphocytic choriomeningitis virus is associated with H-2K and H-2D. *J. Immunol.* 117:1495-1502.
41. Byrne, J.A. and M.B. Oldstone. 1984. Biology of cloned cytotoxic T lymphocytes specific for lymphocytic choriomeningitis virus: clearance of virus in vivo. *J. Virol.* 51:682-686.
42. Thomsen, A.R., J. Johansen, O. Marker, and J.P. Christensen. 1996. Exhaustion of CTL memory and recrudescence of viremia in lymphocytic choriomeningitis virus-infected MHC class II-deficient mice and B cell-deficient mice. *J. Immunol.* 157:3074-3080.

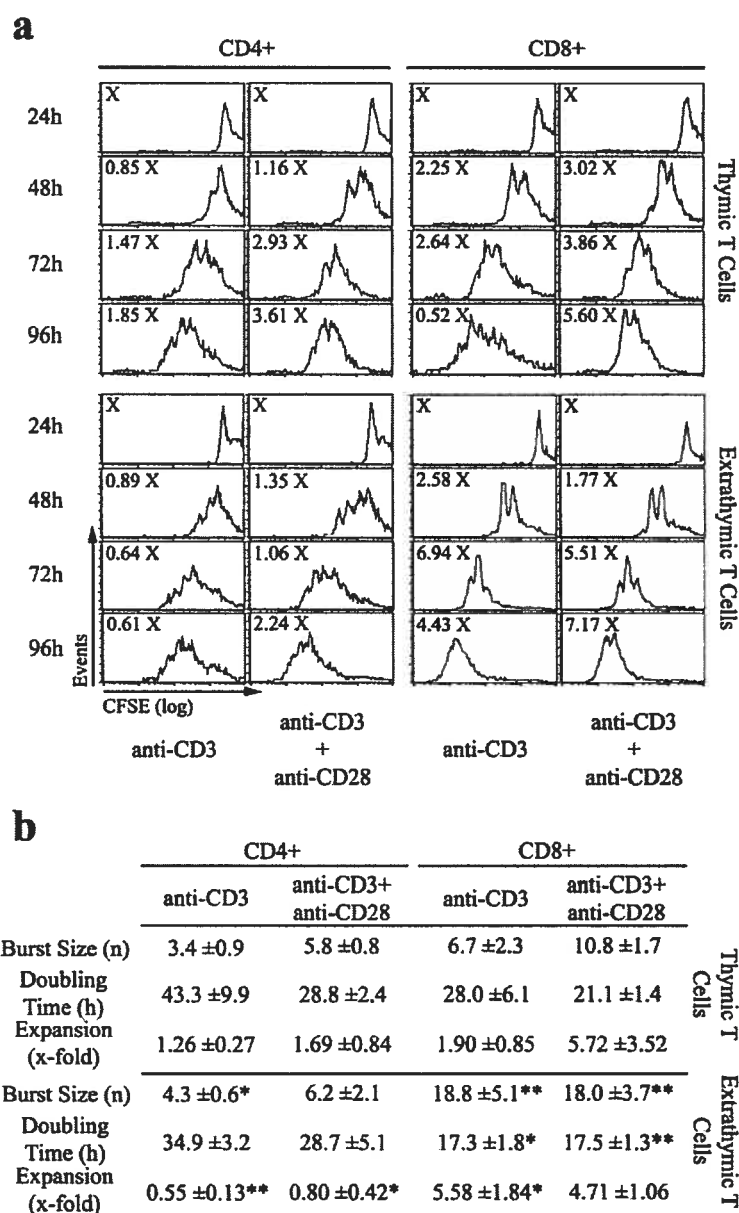
43. Charan,S., A.W.Huegin, A.Cerny, H.Hengartner, and R.M.Zinkernagel. 1986. Effects of cyclosporin A on humoral immune response and resistance against vesicular stomatitis virus in mice. *J.Virol.* 57:1139-1144.
44. Lefrancois,L. 1984. Protection against lethal viral infection by neutralizing and nonneutralizing monoclonal antibodies: distinct mechanisms of action in vivo. *J.Virol.* 51:208-214.
45. Karrer,U., A.Althage, B.Odermatt, C.W.Roberts, S.J.Korsmeyer, S.Miyawaki, H.Hengartner, and R.M.Zinkernagel. 1997. On the key role of secondary lymphoid organs in antiviral immune responses studied in alymphoplastic (aly/aly) and spleenless (Hox11<sup>-/-</sup>) mutant mice. *J.Exp.Med.* 185:2157-2170.
46. Ehl,S., P.Klenerman, P.Aichele, H.Hengartner, and R.M.Zinkernagel. 1997. A functional and kinetic comparison of antiviral effector and memory cytotoxic T lymphocyte populations *in vivo* and *in vitro*. *Eur.J.Immunol.* 27:3404-3413.
47. Welsh,R.M. 2001. Assessing CD8 T cell number and dysfunction in the presence of antigen. *J.Exp.Med.* 193:F19-F22.
48. Orange,J.S., T.P.Salazar-Mather, S.M.Opal, R.L.Spencer, A.H.Miller, B.S.McEwen, and C.A.Biron. 1995. Mechanism of interleukin 12-mediated toxicities during experimental viral infections: role of tumor necrosis factor and glucocorticoids. *J.Exp.Med.* 181:901-914.

49. Wang,S.D., K.J.Huang, Y.S.Lin, and H.Y.Lei. 1994. Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *J.Immunol.* 152:5014-5021.
50. Martin,S. and M.J.Bevan. 1997. Antigen-specific and nonspecific deletion of immature cortical thymocytes caused by antigen injection. *Eur.J.Immunol.* 27:2726-2736.
51. Meunier,M.C., G.Roy-Proulx, N.Labrecque, and C.Perreault. 2003. Tissue distribution of target antigen has a decisive influence on the outcome of adoptive cancer immunotherapy. *Blood* 101:766-770.
52. Muller,U., U.Steinhoff, L.F.Reis, S.Hemmi, J.Pavlovic, R.M.Zinkernagel, and M.Aguet. 1994. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264:1918-1921.
53. van den Broek,M.F., U.Muller, S.Huang, M.Aguet, and R.M.Zinkernagel. 1995. Antiviral defense in mice lacking both  $\alpha/\beta$  and  $\gamma$  interferon receptors. *J.Virol.* 69:4792-4796.
54. Becker,C., H.Pohla, B.Frankenberger, T.Schuler, M.Assenmacher, D.J.Schendel, and T.Blankenstein. 2001. Adoptive tumor therapy with T lymphocytes enriched through an IFN-g capture assay. *Nat.Med.* 7:1159-1162.
55. Seaman,M.S., C.R.Wang, and J.Forman. 2000. MHC class Ib-restricted CTL provide protection against primary and secondary *Listeria monocytogenes* infection. *J.Immunol.* 165:5192-5201.

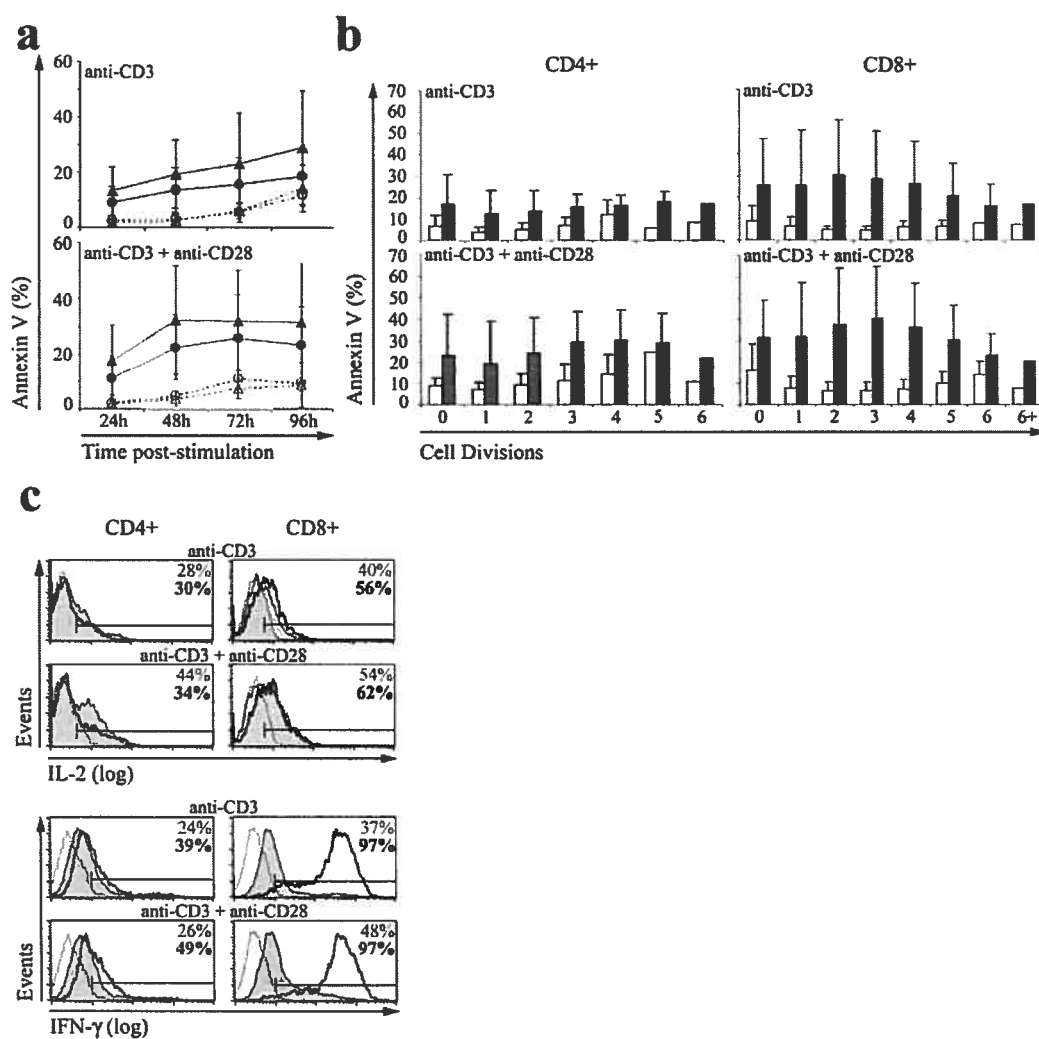
56. Das,G., S.Sheridan, and C.A.Janeway, Jr. 2001. The source of early IFN- $\gamma$  that plays a role in Th1 priming. *J.Immunol.* 167:2004-2010.
57. Berg,R.E., C.J.Cordes, and J.Forman. 2002. Contribution of CD8<sup>+</sup> T cells to innate immunity: IFN-g secretion induced by IL-12 and IL-18. *Eur.J.Immunol.* 32:2807-2816.
58. Pien,G.C., K.B.Nguyen, L.Malmgaard, A.R.Satoskar, and C.A.Biron. 2002. A unique mechanism for innate cytokine promotion of T cell responses to viral infections. *J.Immunol.* 169:5827-5837.
59. Kerksiek,K.M., D.H.Busch, I.M.Pilip, S.E.Allen, and E.G.Pamer. 1999. H2-M3-restricted T cells in bacterial infection: rapid primary but diminished memory responses. *J.Exp.Med.* 190:195-204.
60. Pérarnau,B., M.F.Saron, B.R.San Martin, N.Bervas, H.Ong, M.J.Soloski, J.M.Ure, J.E.Gairin, and F.A.Lemonnier. 1999. Single *H2K<sup>b</sup>*, *H2D<sup>b</sup>* and double *H2K<sup>b</sup>D<sup>b</sup>* knockout mice: peripheral CD8<sup>+</sup> T cell repertoire and anti-lymphocytic choriomeningitis virus cytolytic responses. *Eur.J.Immunol.* 29:1243-1252.
61. Di Rosa,F., S.Ramaswamy, J.P.Ridge, and P.Matzinger. 1999. On the lifespan of virgin T lymphocytes. *J.Immunol.* 163:1253-1257.
62. Tanchot,C. and B.Rocha. 1997. Peripheral selection of T cell repertoires: the role of continuous thymus output. *J.Exp.Med.* 186:1099-1106.

63. Arstila,T.P., A.Casrouge, V.Baron, J.Even, J.Kanellopoulos, and P.Kourilsky. 1999. A direct estimate of the human  $\alpha\beta$  T cell receptor diversity. *Science* 286:958-961.
64. Miller,R.A. 1996. The aging immune system: primer and prospectus. *Science* 273:70-74.
65. Miller,R.A. and C.Chrisp. 2002. T cell subset patterns that predict resistance to spontaneous lymphoma, mammary adenocarcinoma, and fibrosarcoma in mice. *J.Immunol.* 169:1619-1625.
66. Erickson,M., S.Morkowski, S.Lehar, G.Gillard, C.Beers, J.Dooley, J.S.Rubin, A.Rudensky, and A.G.Farr. 2002. Regulation of thymic epithelium by keratinocyte growth factor. *Blood* 100:3269-3278.
67. Poznansky,M.C., R.H.Evans, R.B.Foxall, I.T.Olszak, A.H.Piasecik, K.E.Hartman, C.Brandner, T.H.Meyer, M.J.Pykett, K.T.Chabner, S.A.Kalams, M.Rosenzweig, and D.T.Scadden. 2000. Efficient generation of human T cells from a tissue-engineered thymic organoid. *Nat.Biotechnol.* 18:729-734.
68. Rossi,S., B.R.Blazar, C.L.Farrell, D.M.Danilenko, D.L.Lacey, K.I.Weinberg, W.Krenger, and G.A.Hollander. 2002. Keratinocyte growth factor preserves normal thymopoiesis and thymic microenvironment during experimental graft-versus-host disease. *Blood* 100:682-691.

69. Schmitt,T.M. and J.C.Zuniga-Pflücker. 2002. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by Delta-like-1 in vitro. *Immunity* 17:749-756.
70. Zinkernagel,R.M. 1996. Immunology taught by viruses. *Science* 271:173-178.

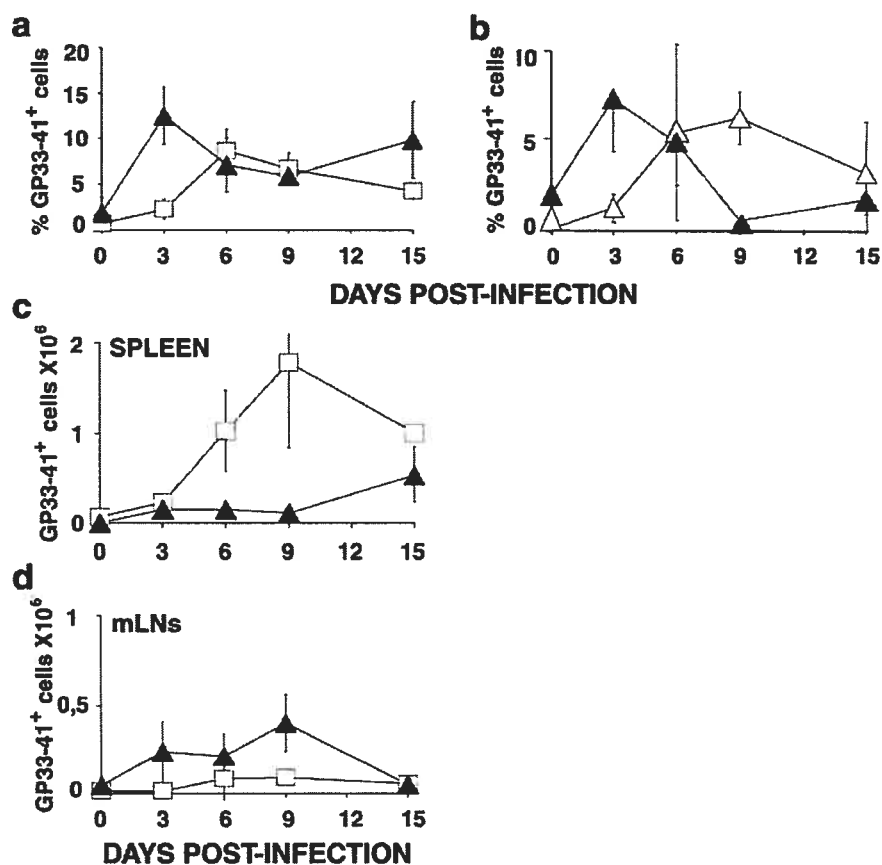


**Figure 1.** *In vitro* proliferation of T lymphocytes of thymic versus extrathymic origin. Spleen T cells from B6 mice (thymic T cells) and from irradiated adult-thymectomized B6.SJL (Ly5.1) hosts reconstituted with LckOM fetal liver cells (Ly5.2; extrathymic T cells) were labeled with CFSE and stimulated with anti-CD3 ± anti-CD28. After culturing for 24 to 96 h, cells were labeled with 7-AAD to exclude dead cells, and stained with antibodies against CD4, CD8, Ly5.1 and Ly5.2. (a) CFSE staining intensity and total cell numbers expressed as a function of X which represents the number of cells/well at 24 h (before the beginning of cell division). This is one representative experiment out of five. (b) Burst size, doubling time and cell accumulation at 72 h (mean ± SD for five experiments). Comparison between thymic and extrathymic T cells (Student's *t* test): \* *p* < 0.05, \*\* *p* < 0.01.

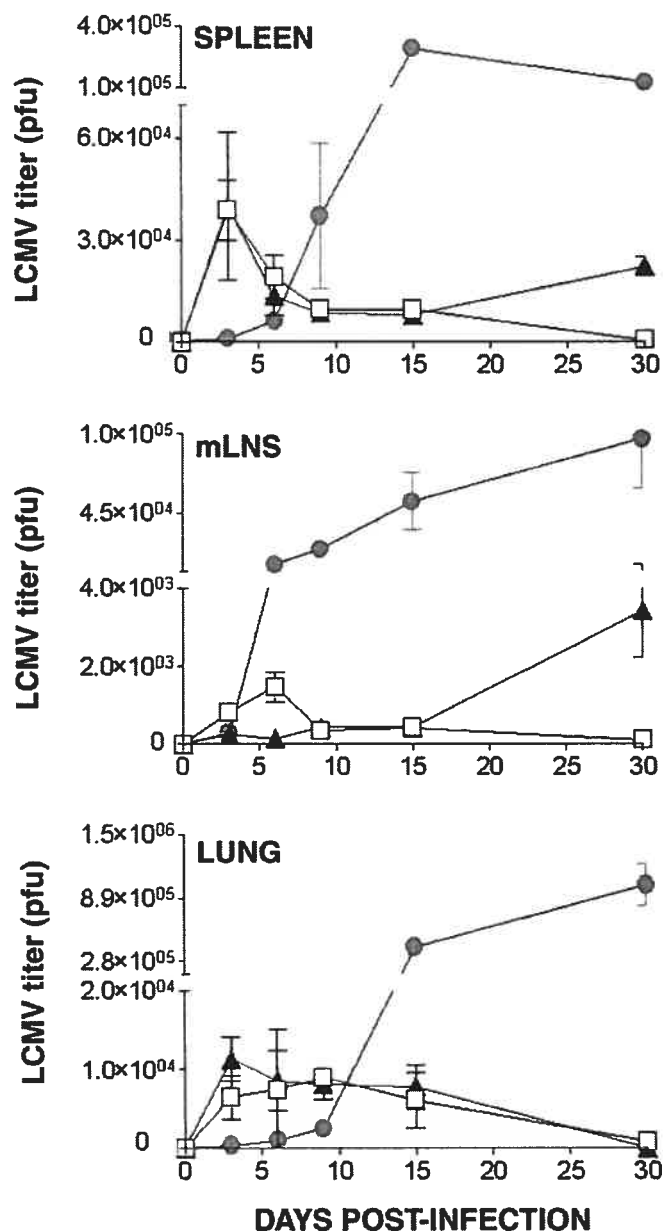


**Figure 2.** Compared with control T cells, extrathymic T lymphocytes show a higher apoptosis rate and produce more IFN- $\gamma$ . T lymphocytes of thymic and extrathymic origin were stimulated with anti-CD3  $\pm$  anti-CD28 as in Fig.1. The proportion of Annexin V stained cells was expressed for (a) whole CD4 (circles) and CD8 (triangles) populations of thymic (open symbols) and extrathymic (closed symbols) origin and (b) as a function of the CFSE content for thymic (open columns) and extrathymic (closed columns) T cells. Three mice per group. (c) Production of cytokines by thymic (shaded histograms) and extrathymic (solid lines) T cells was assessed by intracellular staining with IL-2- and IFN- $\gamma$ -specific antibodies 24 and 72 h after stimulation, respectively. Percentages represent the proportion of cytokine producing thymic (upper numbers) and extrathymic (bold font lower numbers) T cells. This is one representative experiment out of three.

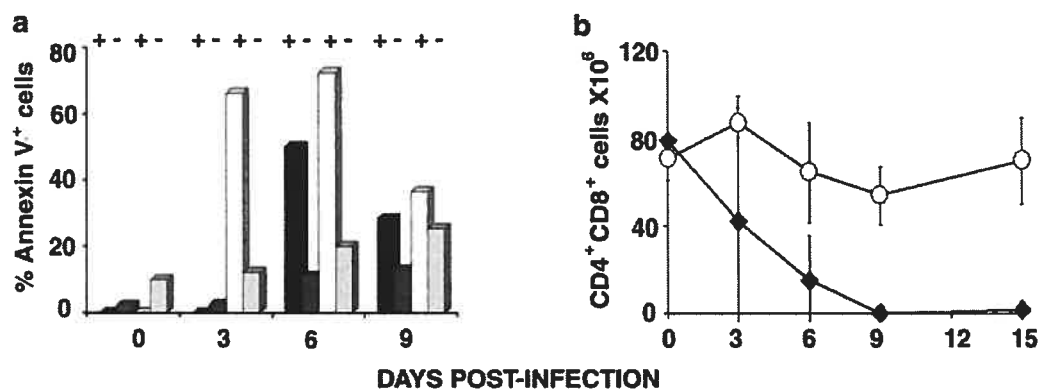




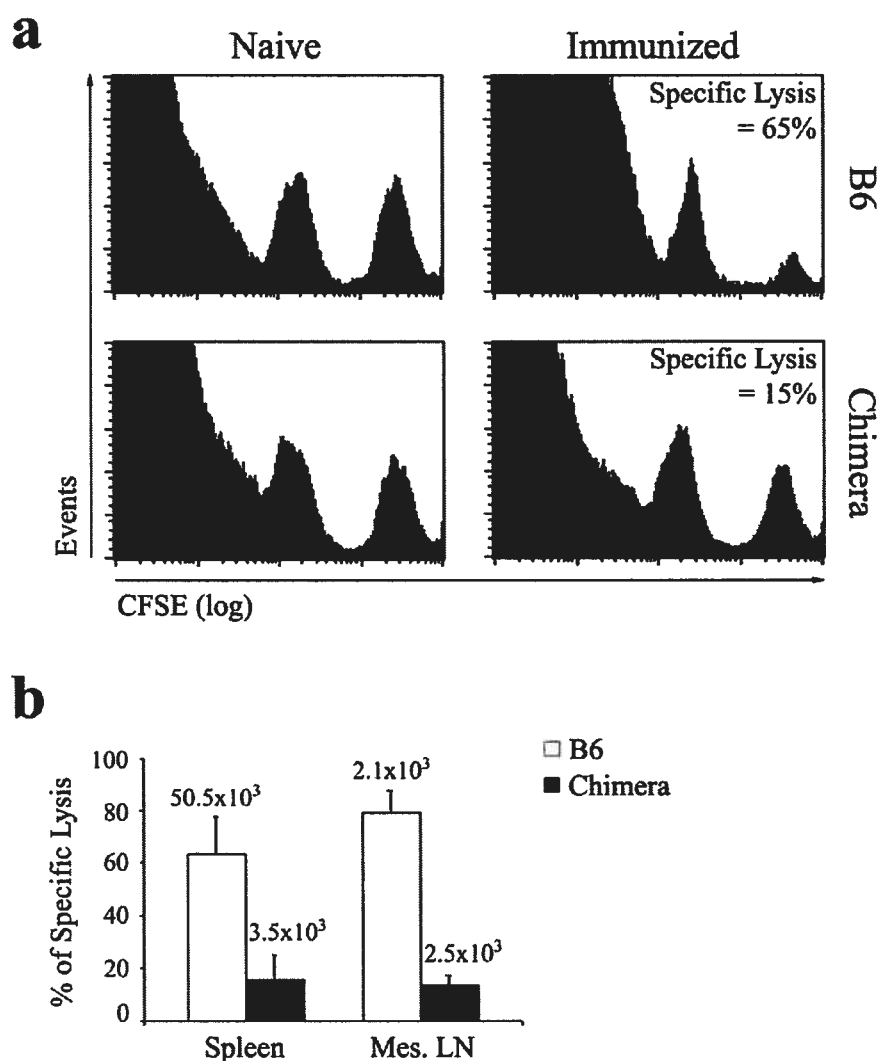
**Figure 3.** LCMV GP33-specific CTL responses generated by thymus derived vs. extrathymic T cells. Tetramer<sup>+</sup> CD8 T cells in the spleen (a, c) and mesenteric LN (d) of B6 mice (control T cells; open squares) and OM→RAG1<sup>-/-</sup> chimeras (extrathymic T cells; closed triangles) following intravenous injection of 200 pfu of LCMV ARM. Three mice per group. (b) OM→B6.SJL chimeras were created by transplantation of LckOM fetal liver into adult-thymectomized-irradiated B6.SJL mice. On day 90 post-transplant these mice presented a mixed lymphoid chimerism. Kinetics of expansion of extrathymic donor-derived T cells (Ly5.2<sup>+</sup>; closed triangles) vs. residual (thymus-derived) host cells (Ly5.1<sup>+</sup>; open triangles) following LCMV infection. Six mice were tested on day 3, and three mice on the other days. Results are depicted as percentages in panels a, b and absolute numbers in panels c, d.



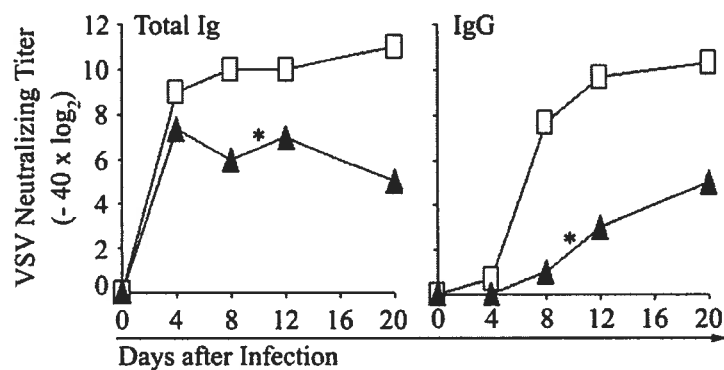
**Figure 4.** Clearance of LCMV-ARM by thymus-derived and extrathymic T cells. Virus titers in the spleen, lung and mesenteric LNs of B6 mice (open squares), OM→RAG1<sup>-/-</sup> chimeras (closed triangles) and RAG1<sup>-/-</sup> mice (circles) following LCMV-ARM infection. Viral titers are expressed per organ in the spleen and lung. Since the LNs cellularity was significantly greater in the chimeras relative to the B6 mice, LNs viral titer are depicted per 10<sup>6</sup> cells rather than per organ for chimeras and B6 mice. Because LNs were profoundly hypocellular in RAG1<sup>-/-</sup> mice, viral titers are expressed for the entire organ. There were three mice per group.



**Figure 5.** Apoptosis of CD8 T cells and depletion of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells following LCMV-ARM infection. (a) Proportion of Annexin V<sup>+</sup> elements among GP33 tetramer<sup>+</sup> (+) and tetramer<sup>-</sup> (-) CD8 T cells in B6 mice (closed bars) and OM→RAG1<sup>-/-</sup> chimeras (open bars). (b) Absolute numbers of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells in the thymus of B6 mice (open circles) and the mesenteric LNs of OM→RAG1<sup>-/-</sup> chimeras (closed diamonds) following LCMV infection. Three to four mice per group.



**Figure 6:** *In vivo* CTL cytotoxicity against GP33-41 coated cells in B6 mice and OM→RAG1<sup>-/-</sup> chimeras after immunization with DCs. Mice were immunized with  $1-2 \times 10^6$  splenic DCs coated with GP33-41 peptide on days 0 and 14. GP33-41-specific cytotoxicity *in vivo* was assessed on day 21. Splenic cells pulsed with  $10^{-6}$  M GP33-41 peptide or not were labeled with a high (250 nM) and low (25 nM) concentration of CFSE, respectively. A 1:1 mixture of these target cell populations was injected intravenously into naïve and immunized mice. After 4 h, the mice were killed and the spleen and mesenteric lymph node were analyzed for the presence of CFSE<sup>high</sup> and CFSE<sup>low</sup> target cell population and the tetramer<sup>+</sup> CD8 T cells. **a**, Data show a representative histogram plot of spleen cells from naïve and immunized mice 4 h after transfer of CFSE labeled target cells. **b**, Percentage of specific lysis in spleen and mesenteric LN of immunized B6 mice and chimeras. The mean numbers of GP33-specific CD8 cells are shown above each bar. There were three mice per group.



**Figure 7.** Antibody responses to VSV-IND in OM<sup>+</sup> chimeras versus control mice. VSV neutralizing antibody titers were assessed in the blood of B6 mice (open squares) and OM→RAG1<sup>-/-</sup> chimeras (closed triangles) following intravenous infection with  $2 \times 10^6$  pfu of VSV Indiana. The data show the values obtained for three mice per point except for days 12 to 20 because two out of three chimeras died on day 10 after infection with VSV (\*).

## DISCUSSION

### I. La prolifération *in vitro*

Nos travaux montrent, dans un premier temps, que, lorsque stimulés *in vitro*, les lymphocytes T CD4 et CD8 d'origine thymique ou extrathymique présentent une différence au niveau de leur expansion. En effet, les CD4 prolifèrent moins et moins rapidement que les CD8, et cette différence se reflète au niveau de l'accumulation cellulaire finale. Cette particularité est en corrélation avec diverses autres expériences menées *in vivo* : lors d'infections avec le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) <sup>103</sup> ou avec des souches recombinantes de *Listeria monocytogenes* <sup>104</sup>, l'expansion des CD4 est retardée, plus faible et plus lente que celle des CD8. Cette différence entre les cellules T CD4 et CD8 est aussi retrouvée au niveau de leur prolifération homéostatique <sup>105</sup>. Ces données indiquent qu'en plus d'avoir des fonctions effectrices distinctes, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> répondent différemment à une activation. Ceci suggère que la cascade d'activation intracellulaire menant à la prolifération des cellules et les gènes activés lors d'une stimulation présentent des différences entre les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Ces particularités sont d'autant plus remarquables qu'elles se retrouvent aussi chez les cellules T de la souris LckOM (extrathymique), où la sélection positive du répertoire T diffère de celle observée chez une souris normale (intrathymique) <sup>98;99</sup>. Ceci laisse supposer que l'endroit du développement T et les mécanismes de celui-ci n'interfèrent pas avec les événements intracellulaire d'activation des CD4 et des CD8.

Dans un deuxième temps, nos travaux montrent que la prolifération des lymphocytes T extrathymiques produits sous l'influence de l'OM est plus rapide que celle des cellules T thymiques, lorsque la stimulation est apportée via le TCR : leur capacité proliférative est plus élevée et leur temps de division plus court que ceux des cellules T thymiques. Cette différence peut s'expliquer par le phénotype activé des lymphocytes T LckOM similaire à celui de cellules T mémoires <sup>14</sup>. En effet, outre au niveau de leur phénotype, les lymphocytes T mémoires et les lymphocytes T naïfs présentent des différences fonctionnelles. Tout d'abord, alors que les cellules T

naïves ont besoin d'être stimulées pendant environ 20h pour être commises à proliférer, le seuil d'activation des cellules T mémoires est plus faible. Ceci est dû au fait que la machinerie de signalisation permettant l'entrée en division est couplée de façon plus efficace chez les lymphocytes T mémoires <sup>106</sup> : dans ces dernières, la kinase lck nécessaire à la transduction du signal d'activation, est associée à la fois au co-récepteur CD8 et au TCR; chez les lymphocytes T naïfs, cette protéine est plutôt distribuée dans le cytoplasme et peu couplée aux éléments d'activation <sup>48</sup>.

La costimulation apportée par l'anti-CD28 permet aux cellules T thymiques de proliférer plus rapidement, alors qu'elle n'a que peu d'effet sur l'expansion des cellules T extrathymiques, particulièrement pour les T CD8<sup>+</sup>. La costimulation via le CD28 diminue le seuil d'activation des lymphocytes T naïfs. En effet, l'engagement du CD28 mène à la redistribution et au recrutement des microdomaines de la membrane riches en kinases intracellulaires et membranaires au site d'engagement du TCR, augmentant ainsi la concentration locale de kinases et d'adapteurs nécessaires à la transduction du signal d'activation. Ce processus mène à une phosphorylation plus forte et plus stable des tyrosines de plusieurs substrats et à une plus forte consommation de la kinase lck <sup>107;108</sup>. En plus de diminuer le seuil du signal d'activation des lymphocytes T naïfs, la costimulation par le CD28 permet d'obtenir une expression prolongée de l'expression du récepteur à l'IL-2, amenant les cellules à être plus réceptives à l'effet de cette cytokine <sup>109</sup>, et augmente à la fois le nombre de cellules T qui participent à la réponse proliférative et leur capacité proliférative <sup>101</sup>. Par contre, si les lymphocytes T naïfs ont besoin de costimulation pour une prolifération maximale, les lymphocytes T mémoires sont, pour leur part moins dépendants de ce signal. En effet, puisque la machinerie de signalisation est déjà couplée de façon efficace chez les cellules T mémoires, l'apport de la costimulation sera minime. Par conséquent, la différence observée entre les cellules T d'origine thymique et les cellules T LckOM en ce qui concerne l'effet du CD28 appuie l'hypothèse que les lymphocytes T d'origine extrathymique aient, en plus de leur phénotype, des fonctions de cellules T mémoires. En contre-partie, étant donné que les lymphocytes T extrathymiques semblent réagir de la même manière que des cellules T mémoires, il est probable que la majeure partie des réarrangements

intracellulaires menant à l'activation cellulaire soit déjà en place dans ces cellules, leur permettant d'être activées plus rapidement sans nécessiter de costimulation.

Le pourcentage de cellules productrices de cytokines est plus élevé chez les lymphocytes T LckOM que chez leur contre-partie d'origine thymique. Ceci est particulièrement vrai pour les CD8 et la production d'IFN- $\gamma$ . Les CD8 mémoires expriment de façon constitutive l'ARNm de nombreuses molécules effectrices, dont l'IL-2, l'IFN- $\gamma$ , le FasL et la perforine <sup>28</sup>. Par conséquent, ils sont capables d'engager leurs fonctions effectrices plus rapidement que des lymphocytes T naïfs, et donc de produire toute une panoplie de cytokines nécessaires à la résolution de la réponse immunitaire. Or les lymphocytes T extrathymiques montrent, tant au niveau de leur phénotype qu'au niveau de leur capacité proliférative, des caractéristiques les rapprochant de cellules ayant déjà subi une activation, ce qui explique une plus forte production de cytokines, dont l'IFN- $\gamma$ , molécule clé des réponses immunitaires cellulaires.

L'expansion rapide et intense des lymphocytes T LckOM est limitée par un taux d'apoptose plus élevé que celui observé chez les cellules T d'origine thymique. Ce haut niveau de mort cellulaire est indépendant du nombre de divisions effectué, suggérant que les lymphocytes T extrathymiques sont plus susceptibles à l'apoptose, même au repos, que leur contre-partie thymique. Les lymphocytes T activés/mémoires, après une longue stimulation, sont plus prédisposés à subir l'AICD que les cellules T naïves <sup>106</sup>. De plus, des études récentes ont montré que l'IL-2 induit la mort des cellules mémoires en division, limitant ainsi leur expansion <sup>33;110</sup>. De plus, cette même cytokine limite la prolifération continue des cellules T via la diminution de l'expression de la chaîne  $\gamma$  de son récepteur, ce qui entraîne la réduction des niveaux de Bcl-2 et rend les cellules susceptibles à l'apoptose <sup>111</sup>. Or, le pourcentage de cellules extrathymiques produisant de l'IL-2 est élevé, suggérant une forte sécrétion de cette cytokine dans le milieu de culture. Par conséquent, les lymphocytes T extrathymiques, ayant des caractéristiques de cellules mémoires, seraient plus susceptibles d'entrer en apoptose par l'effet de l'IL-2 que les cellules T naïves d'origine thymique. Récemment, il a aussi été montré que l'IFN- $\gamma$  a un rôle dans la régulation de l'AICD des CD4<sup>+</sup> <sup>112</sup>. En effet, cette cytokine limite l'expansion



cellulaire des lymphocytes T en réduisant leur survie par le contrôle de l'expression de la caspase 8, induisant ainsi leur apoptose <sup>112</sup>. Or les lymphocytes T extrathymiques expriment fortement l'IFN- $\gamma$ , ce qui pourrait expliquer le taux élevé d'apoptose observé pour ces cellules. Il est aussi à noter que lors d'une expansion homéostatique suite à une greffe de moelle osseuse, les lymphocytes T montrant un phénotype activé sont prédisposés à subir l'apoptose. Cette susceptibilité accrue est accompagnée d'une expression diminuée de Bcl-2 pour des niveaux normaux de Bax. Ceci entraîne donc un débalancement du ratio Bcl-2/Bax et l'activation de la cascade apoptotique cellulaire <sup>113</sup>. De plus, lors d'une infection virale, les lymphocytes T mémoires non-spécifiques seront éliminés par les lymphocytes T spécifiques activés par un mécanisme dépendant de l'expression du récepteur à l'IFN- $\gamma$  sur les premières et de FasL sur les dernières <sup>114;115</sup>. Dans ce contexte, il se pourrait que les lymphocytes T extrathymiques activés *in vitro* entraînent l'apoptose des cellules avoisinantes par un mécanisme similaire, hypothèse corroborée par le taux d'apoptose observé dans la population CD8 non-spécifique chez les chimères LckOM lors d'une infection avec le LCMV <sup>116</sup>.

Toutes ces données sur l'activation *in vitro* des lymphocytes T extrathymiques produits sous l'influence de l'OM suggèrent que ces derniers ont, en plus de leur phénotype, les caractéristiques de cellules T ayant déjà été activées. Cela leur donne un avantage sur les lymphocytes T naïfs d'origine thymique : en présence d'un pathogène, ils devraient proliférer plus rapidement et engager d'une manière plus efficace leurs fonctions effectrices. Par contre, le haut niveau d'apoptose dont ils sont sujets laissent présager un épuisement plus précoce que pour les lymphocytes T thymiques.

## II. L'immunisation *in vivo*

Après une immunisation intraveineuse avec des cellules dendritiques chargées de peptide, ces dernières migrent préférentiellement dans les zones T de la rate où elles présentent le peptide aux cellules T. Une telle immunisation permet d'obtenir une bonne réponse des lymphocytes T et de générer une réponse immunitaire mémoire protectrice, au moins contre LCMV et *Listeria monocytogenes*<sup>102;117</sup>. Par conséquent, l'immunisation avec des cellules dendritiques chargées avec du peptide représente un bon moyen de savoir si une souris est capable de générer une réponse immunitaire *in vivo*, sans les effets néfastes rencontrés lors d'une infection avec un pathogène.

Après l'immunisation de chimères LckOM avec des cellules dendritiques chargées avec le peptide GP33-41, les CD8 transgéniques présentent une faible cytotoxicité dans la rate et les ganglions mésentériques comparés aux contrôles et une faible expansion dans la rate. Par contre, le nombre de lymphocytes T spécifiques générés dans les ganglions mésentériques est similaire chez les deux types de souris. Ceci suggère que les cellules T extrathymiques exhibent à la fois un défaut quantitatif au niveau de leur prolifération mais aussi un défaut qualitatif pour ce qui est de leurs fonctions cytolytiques.

Une explication possible, en tenant compte des caractéristiques des cellules T LckOM *in vitro*, est que les lymphocytes T extrathymiques prolifèrent très rapidement suite à la stimulation par les cellules dendritiques. Mais à cause de leur haut taux d'apoptose, la majorité des cellules ayant été activées va mourir par AICD. Ceci laisse une population de lymphocytes T spécifiques trop faible en nombre et épuisée pour montrer une activité cytotoxique significative.

Cette hypothèse est corroborée par les études d'infection avec le LCMV de chimères LckOM. En effet, l'expansion des CD8 observée chez ces souris après infection est de loin plus rapide que celle des CD8 thymiques mais limitée par un taux d'apoptose des lymphocytes T spécifiques drastique. Ceci a pour conséquence l'élimination apparente transitoire du virus suivie d'une réapparition au jour 30 dans les organes lymphoïdes<sup>116</sup>.

Une situation similaire a déjà été observée dans différentes expériences. Alors qu'une infection à faible dose permet le contrôle du virus dans une souris normale, une forte dose de LCMV entraîne une forte prolifération des CD8 spécifiques précoce mais une perte de contrôle du virus. Ceci est accompagné par un déclin presque total des CTL spécifiques <sup>118</sup>. De plus, une diminution dans le nombre de précurseurs CTL résulte en une perte du contrôle du virus menant à sa persistance <sup>119</sup>. Enfin, le transfert de CD8 spécifiques pour le LCMV dans une souris infectée dans la période néonatale (persistance virale) entraîne une diminution du titre viral suivie par une recrudescence du virus en parallèle avec un épuisement des CTL transférés <sup>120</sup>.

## CONCLUSIONS

Les lymphocytes T extrathymiques produits sous l'influence de l'OM montrent un phénotype et des fonctions associées à des lymphocytes T ayant été préalablement activés. Ils prolifèrent beaucoup plus rapidement et intensément que les cellules T d'origine thymique, ont des fonctions effectrices plus fortes. Par contre, leur taux d'apoptose élevé limite énormément ces qualités en induisant un épuisement cellulaire précoce, ce qui a pour principale conséquence de diminuer l'efficacité de leur réponse immunitaire contre un pathogène.

Pourtant, ces lymphocytes ne sont pas dénués d'intérêt. En effet, un des points forts de ces cellules est la production importante d'IFN- $\gamma$  après stimulation. L'IFN- $\gamma$  est, pour sa part, un régulateur de croissance cellulaire et exerce une activité immunomodulatoire : produits par les NK, les CD4 Th1 et les CTL, cette cytokine régule l'immunité innée et acquise, et augmente l'expression du CMH de classe I et de classe II <sup>53</sup>. Par conséquent, l'IFN- $\gamma$  représente une molécule importante dans la régulation de la réponse immunitaire et les lymphocytes T LckOM, en produisant cette cytokine tôt dans la réponse contre un agent infectieux, pourraient moduler les fonctions effectrices d'autres lymphocytes T afin d'éliminer plus efficacement le pathogène.

Si les lymphocytes T extrathymiques sont incapables d'éliminer le LCMV de l'hôte, ils sont tout de même aptes à diminuer les titres viraux en dessous des limites de détection au début de l'infection. Ceci est probablement dû au fait que l'IFN- $\gamma$  jouent un rôle important dans la phase précoce de l'infection en inhibant la réplication virale illimitée <sup>121;122</sup>. Donc la capacité des cellules T LckOM à répondre rapidement à un antigène étranger et à produire de l'IFN- $\gamma$  les place du côté des régulateurs de l'immunité.

Les lymphocytes T LckOM seraient en fait plus proches des cellules T extrathymiques retrouvées dans des souris normales que des lymphocytes T conventionnels. En effet, les deux types de population exhibent un phénotype activé <sup>14;82</sup> et, suite à une stimulation, vont proliférer rapidement mais décliner tout aussi vite <sup>82;84</sup>. De plus, ces deux populations montrent une tendance plus forte à l'apoptose *in*

*vitro* et *in vivo* <sup>81;85</sup>. Or, les lymphocytes T extrathymiques de souris normales présentent la capacité d'agir efficacement contre la malaria et de générer une réponse mémoire protectrice <sup>82;84</sup>. Donc les lymphocytes T LckOM pourraient, contre des pathogènes autres que le LCMV, répondre efficacement et en permettre l'élimination.

Les lymphocytes T LckOM présentent aussi des similarités avec les lymphocytes T restreints par le CMH-Ib. En effet, ces deux populations sont sélectionnées efficacement sur des cellules hématopoïétiques <sup>71;99</sup> et présentent un phénotype activé <sup>14;71</sup>. De plus, après stimulation avec de l'anti-CD3, ces deux types de lymphocytes produisent rapidement de l'IFN- $\gamma$  <sup>71</sup>, et dans le contexte d'une infection, leur pic d'expansion apparaît plus tôt que celui de lymphocytes T naïfs conventionnels <sup>72;116</sup>. Ces deux populations pourraient donc avoir des fonctions similaires au niveau de la réponse immunitaire : elles pourraient avoir une contribution majeure à l'établissement de la réponse innée par la sécrétion rapide de cytokines, permettant ainsi aux lymphocytes T conventionnels d'être adéquatement activés sans épuisement précoce.

Tous les résultats présentés ici montrent à quel point le micro-environnement dans lequel la maturation des lymphocytes T a lieu, est important pour générer un répertoire de lymphocytes capables de répondre efficacement contre des virus et de les éliminer. Enfin, tout ceci montre à quel point l'environnement intrathymique, tant par les cellules qui le composent que par les molécules qui y sont présentes, est essentiel à la différenciation de lymphocytes T matures capables d'offrir une réponse anti-virale adéquate. Bien que de nombreux aspects des lymphocytes T LckOM soient encore à étudier, le point majeur qui ressort de cette étude sur la fonction de ces cellules est que le thymus, centre principal de la lymphopoïèse T, n'a pas trouvé de remplaçant.

## PERSPECTIVES FUTURES

De nombreux aspects chez la souris LckOM restent encore à élucider, tant au niveau fonctionnel que du développement. En effet, il serait tout d'abord intéressant de connaître les mécanismes intracellulaires et génétiques qui régulent la prolifération et l'apoptose des lymphocytes T LckOM versus des lymphocytes T thymiques afin de mieux comprendre les différences entre ces deux populations. De plus, il serait passionnant d'étudier la réponse contre différents pathogènes des cellules T LckOM en présence d'un répertoire T conventionnel, en transférant des lymphocytes T extrathymiques dans des souris B6 non-thymectomisées et non-irradiées. Ceci permettrait d'étudier en même temps l'effet des cellules T LckOM sur une réponse immunitaire normale.

Dans les expériences réalisées *in vivo* avec le VSV (vesicular stomatitis virus), les souris LckOM montrent l'incapacité à produire des IgG <sup>116</sup>. Ceci suggère une déficience en CD4. En effet, ce virus induit une réponse IgM précoce indépendante des Th, mais qui est suivie par une réponse IgG neutralisante dépendante des CD4 <sup>123</sup>. Par conséquent, il serait crucial de comprendre les mécanismes entourant la défectuosité des lymphocytes T CD4 LckOM: est-ce à cause de leur différenciation? d'un défaut au niveau de l'interaction T-B? ou bien d'un mécanisme intrinsèque présents chez ces cellules?

Une réponse partielle peut déjà être avancée, bien que ce ne soit qu'une hypothèse : différentes études montrent que les lymphocytes T CD4 sont plus dépendants d'une fonction thymique normale que les CD8 <sup>79;124;125</sup>. Par conséquent, les mécanismes de la sélection des CD4 dans les ganglions LckOM seraient une bonne cible pour comprendre le défaut des CD4 LckOM.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Spits H. 2002. Development of alphabeta T cells in the human thymus. *Nat Rev Immunol* 2:760-772.
2. Tanchot C and Rocha B. 1998. The organization of mature T-cell pools. *Immunol Today* 19:575-579.
3. Goldrath AW and Bevan MJ. 1999. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402:255-262.
4. Gabor MJ, Scollay R, and Godfrey DI. 1997. Thymic T cell export is not influenced by the peripheral T cell pool. *Eur J Immunol* 27:2986-2993.
5. Benoist C and Mathis D. 1999. T-lymphocyte differentiation and biology. *Fundamental immunology, fourth edition* WE Paul, Editor. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia:367-409.
6. Modigliani Y, Coutinho G, Buren-Defranoux O, Coutinho A, and Bandeira A. 1994. Differential contribution of thymic outputs and peripheral expansion in the development of peripheral T cell pools. *Eur J Immunol* 24:1223-1227.
7. Berzins SP, Boyd RL, and Miller JF. 1998. The role of the thymus and recent thymic migrants in the maintenance of the adult peripheral lymphocyte pool. *J Exp Med* 187:1839-1848.
8. Tanchot C and Rocha B. 1997. Peripheral selection of T cell repertoires: the role of continuous thymus output. *J Exp Med* 186:1099-1106.
9. Miller RA. 1999. Aging and immune function. *Fundamental immunology, fourth edition* WE Paul, Editor. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia:947-966.

10. Picker LJ and Siegelman MH. 1999. Lymphoid tissues and organs. *Fundamental immunology, fourth edition* WE Paul, Editor. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia:479-531.
11. McGhee JR and Kiyono H. 1999. The mucosal immune system. *Fundamental immunology, fourth edition* WE Paul, Editor. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia:909-945.
12. Wallace PM, MacMaster JF, Rouleau KA, Brown TJ, Loy JK, Donaldson KL, and Wahl AF. 1999. Regulation of inflammatory responses by oncostatin M. *J Immunol* 162:5547-5555.
13. Clegg CH, Rulffes JT, Wallace PM, and Haugen HS. 1996. Regulation of an extrathymic T-cell development pathway by oncostatin M. *Nature* 384:261-263.
14. Boileau C, Houde M, Dulude G, Clegg CH, and Perreault C. 2000. Regulation of extrathymic T cell development and turnover by oncostatin M. *J Immunol* 164:5713-5720.
15. Goldrath AW, Bogatzki LY, and Bevan MJ. 2000. Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *J Exp Med* 192:557-564.
16. Anderson G, Moore NC, Owen JJ, and Jenkinson EJ. 1996. Cellular interactions in thymocyte development. *Annu Rev Immunol* 14:73-99.
17. Germain RN. 2002. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2:309-322.
18. Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, Gliniak BC, Park LS, Ziegler SF, Williams DE, Ware CB, Meyer JD, and Davison BL. 1994. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 180:1955-1960.



19. Sha WC, Nelson CA, Newberry RD, Kranz DM, Russell JH, and Loh DY. 1988. Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. *Nature* 336:73-76.
20. Delaney JR, Sykulev Y, Eisen HN, and Tonegawa S. 1998. Differences in the level of expression of class I major histocompatibility complex proteins on thymic epithelial and dendritic cells influence the decision of immature thymocytes between positive and negative selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5235-5240.
21. Pircher H, Burki K, Lang R, Hengartner H, and Zinkernagel RM. 1989. Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature* 342:559-561.
22. Baldwin KK, Trenchak BP, Altman JD, and Davis MM. 1999. Negative selection of T cells occurs throughout thymic development. *J Immunol* 163:689-698.
23. Zinkernagel RM and Althage A. 1999. On the role of thymic epithelium vs. bone marrow-derived cells in repertoire selection of T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8092-8097.
24. Zerrahn J, Volkmann A, Coles MC, Held W, Lemonnier FA, and Raulet DH. 1999. Class I MHC molecules on hematopoietic cells can support intrathymic positive selection of T cell receptor transgenic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11470-11475.
25. Martinic MM, Rulicke T, Althage A, Odermatt B, Hochli M, Lamarre A, Dumrese T, Speiser DE, Kyburz D, Hengartner H, and Zinkernagel RM. 2003. Efficient T cell repertoire selection in tetraparental chimeric mice independent of thymic epithelial MHC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1861-1866.
26. Sprent J and Tough DF. 2001. T cell death and memory. *Science* 293:245-248.

27. Sprent J and Surh CD. 2002. T cell memory. *Annu Rev Immunol* 20:551-579.
28. Tanchot C, Lemonnier FA, Perarnau B, Freitas AA, and Rocha B. 1997. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* 276:2057-2062.
29. Takeda S, Rodewald HR, Arakawa H, Bluethmann H, and Shimizu T. 1996. MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4+ T cells, but affect their long-term life span. *Immunity* 5:217-228.
30. Polic B, Kunkel D, Scheffold A, and Rajewsky K. 2001. How alpha beta T cells deal with induced TCR alpha ablation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8744-8749.
31. Labrecque N, Whitfield LS, Obst R, Waltzinger C, Benoist C, and Mathis D. 2001. How much TCR does a T cell need? *Immunity* 15:71-82.
32. Kirberg J, Berns A, and von Boehmer H. 1997. Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *J Exp Med.* 186:1269-1275.
33. Jameson SC. 2002. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2:547-556.
34. Boursalian TE and Bottomly K. 1999. Survival of naive CD4 T cells: roles of restricting versus selecting MHC class II and cytokine milieu. *J Immunol.* 162:3795-3801.
35. Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, and Lefrancois L. 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1:426-432.
36. Tan JT, Dudl E, LeRoy E, Murray R, Sprent J, Weinberg KI, and Surh CD. 2001. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8732-8737.

37. von Boehmer H and Hafen K. 1993. The life span of naive alpha/beta T cells in secondary lymphoid organs. *J Exp Med* 177:891-896.
38. Swain SL, Bradley LM, Croft M, Tonkonogy S, Atkins G, Weinberg AD, Duncan DD, Hedrick SM, Dutton RW, and Huston G. 1991. Helper T-cell subsets: phenotype, function and the role of lymphokines in regulating their development. *Immunol.Rev.* 123:115-144.
39. Zhang X, Sun S, Hwang I, Tough DF, and Sprent J. 1998. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8:591-599.
40. Jenkins MK, Khoruts A, Ingulli E, Mueller DL, McSorley SJ, Reinhardt RL, Itano A, and Pape KA. 2001. In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol* 19:23-45.
41. Kaech SM, Wherry EJ, and Ahmed R. 2002. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2:251-262.
42. Campbell JJ, Murphy KE, Kunkel EJ, Brightling CE, Soler D, Shen Z, Boisvert J, Greenberg HB, Viera MA, Goodman SB, Genovese MC, Wardlaw AJ, Butcher EC, and Wu L. 2001. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J Immunol* 166:877-884.
43. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, and Lanzavecchia A. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712.
44. Reinhardt RL, Khoruts A, Merica R, Zell T, and Jenkins MK. 2001. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 410:101-105.

45. Weninger W, Crowley MA, Manjunath N, and von Andrian UH. 2001. Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells. *J Exp Med* 194:953-966.
46. Harris NL, Watt V, Ronchese F, and Le Gros G. 2002. Differential T cell function and fate in lymph node and nonlymphoid tissues. *J Exp Med* 195:317-326.
47. Masopust D, Vezys V, Marzo AL, and Lefrancois L. 2001. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* 291:2413-2417.
48. Bachmann MF, Gallimore A, Linkert S, Cerundolo V, Lanzavecchia A, Kopf M, and Viola A. 1999. Developmental regulation of Lck targeting to the CD8 coreceptor controls signaling in naive and memory T cells. *J Exp Med* 189:1521-1529.
49. Kedl RM and Mescher MF. 1998. Qualitative differences between naive and memory T cells make a major contribution to the more rapid and efficient memory CD8+ T cell response. *J Immunol* 161:674-683.
50. Lodolce JP, Boone DL, Chai S, Swain RE, Dassopoulos T, Trettin S, and Ma A. 1998. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 9:669-676.
51. Schluns KS, Williams K, Ma A, Zheng XX, and Lefrancois L. 2002. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J Immunol* 168:4827-4831.
52. Lanzavecchia A. 1998. Immunology. Licence to kill. *Nature* 393:413-414.
53. Katze MG, He Y, and Gale M Jr. 2002. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* 2:675-687.

54. Farber DL. 1998. Differential TCR signaling and the generation of memory T cells. *J Immunol* 160:535-539.
55. Seder RA, Germain RN, Linsley PS, and Paul WE. 1994. CD28-mediated costimulation of interleukin 2 (IL-2) production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and interferon gamma production. *J Exp Med* 179:299-304.
56. Kaech SM and Ahmed R. 2001. Memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* 2:415-422.
57. Wong P and Pamer EG. 2001. Cutting edge: antigen-independent CD8 T cell proliferation. *J Immunol* 166:5864-5868.
58. van Stipdonk MJ, Lemmens EE, and Schoenberger SP. 2001. Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat Immunol* 2:423-429.
59. Wherry EJ, Becker TC, Boone D, Kaja MK, Ma A, and Ahmed R. 2002. Homeostatic proliferation but not the generation of virus specific memory CD8 T cells is impaired in the absence of IL-15 or IL-15Ralpha. *Adv* 512:165-175.
60. Yu A, Zhou J, Marten N, Bergmann CC, Mammolenti M, Levy RB, and Malek TR. 2003. Efficient induction of primary and secondary T cell-dependent immune responses in vivo in the absence of functional IL-2 and IL-15 receptors. *J Immunol*. 170:236-242.
61. Badovinac VP, Porter BB, and Harty JT. 2002. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol* 3:619-626.
62. Coles RM, Mueller SN, Heath WR, Carbone FR, and Brooks AG. 2002. Progression of armed CTL from draining lymph node to spleen shortly after localized infection with herpes simplex virus 1. *J Immunol* 168:834-838.

63. Hirata T, Furie BC, and Furie B. 2002. P-, E-, and L-selectin mediate migration of activated CD8<sup>+</sup> T lymphocytes into inflamed skin. *J Immunol* 169:4307-4313.
64. Openshaw P, Murphy EE, Hosken NA, Maino V, Davis K, Murphy K, and O'Garra A. 1995. Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations. *J Exp Med* 182:1357-1367.
65. Bird JJ, Brown DR, Mullen AC, Moskowitz NH, Mahowald MA, Sider JR, Gajewski TF, Wang CR, and Reiner SL. 1998. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* 9:229-237.
66. Iezzi G, Scotet E, Scheidegger D, and Lanzavecchia A. 1999. The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization. *Eur J Immunol* 29:4092-4101.
67. Russell JH and Ley TJ. 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 20:323-370.
68. Barry M and Bleackley RC. 2002. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2:401-409.
69. Henkart PA. 1999. Cytotoxic T lymphocytes. *Fundamental immunology, fourth edition* WE Paul, Editor. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia:1021-1049.
70. Murali-Krishna K and Ahmed R. 2000. Cutting edge: naive T cells masquerading as memory cells. *J Immunol* 165:1733-1737.
71. Urdahl KB, Sun JC, and Bevan MJ. 2002. Positive selection of MHC class Ib-restricted CD8(+) T cells on hematopoietic cells. *Nat Immunol* 3:772-779.

72. Seaman MS, Wang CR, and Forman J. 2000. MHC class Ib-restricted CTL provide protection against primary and secondary *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 165:5192-5201.
73. Bendelac A, Rivera MN, Park SH, and Roark JH. 1997. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* 15:535-562.
74. Gapin L, Matsuda JL, Surh CD, and Kronenberg M. 2001. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat Immunol* 2:971-978.
75. Ohteki T, Ho S, Suzuki H, Mak TW, and Ohashi PS. 1997. Role for IL-15/IL-15 receptor beta-chain in natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha beta+ cell development. *J Immunol* 159:5931-5935.
76. Hammond KJ, Pelikan SB, Crowe NY, Randle-Barrett E, Nakayama T, Taniguchi M, Smyth MJ, van Driel IR, Scollay R, Baxter AG, and Godfrey DI. 1999. NKT cells are phenotypically and functionally diverse. *Eur J Immunol* 29:3768-3781.
77. Shimamura M, Ohteki T, Launois P, Garcia AM, and MacDonald HR. 1997. Thymus-independent generation of NK1+ T cells in vitro from fetal liver precursors. *J Immunol* 158:3682-3689.
78. Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L, Nakayama T, Taniguchi M, Wang CR, Koezuka Y, and Kronenberg M. 2000. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med* 192:741-753.
79. Kennedy JD, Pierce CW, and Lake JP. 1992. Extrathymic T cell maturation. Phenotypic analysis of T cell subsets in nude mice as a function of age. *J Immunol* 148:1620-1629.
80. Guy-Grand D, Azogui O, Celli S, Darche S, Nussenzweig MC, Kourilsky P, and Vassalli P. 2003. Extrathymic T cell lymphopoiesis: ontogeny and

contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice. *J Exp Med* 197:333-341.

81. Yamada H, Nakamura T, Matsuzaki G, Iwamoto Y, and Nomoto K. 2000. TCR-independent activation of extrathymically developed, self antigen-specific T cells by IL-2/IL-15. *J Immunol* 164:1746-1752.
82. Abo T. 2001. Extrathymic pathways of T-cell differentiation and immunomodulation. *Int Immunopharmacol* 1:1261-1273.
83. Yamada H, Ninomiya T, Hashimoto A, Tamada K, Takimoto H, and Nomoto K. 1998. Positive selection of extrathymically developed T cells by self-antigens. *J Exp Med* 188:779-784.
84. Mannoor MK, Halder RC, Morshed SR, Ariyasinghe A, Bakir HY, Kawamura H, Watanabe H, Sekikawa H, and Abo T. 2002. Essential role of extrathymic T cells in protection against malaria. *J Immunol* 169:301-306.
85. Yamada H, Matsuzaki G, Chen Q, Iwamoto Y, and Nomoto K. 2001. Reevaluation of the origin of CD44(high) "memory phenotype" CD8 T cells: comparison between memory CD8 T cells and thymus-independent CD8 T cells. *Eur J Immunol* 31:1917-1926.
86. Poussier P, Edouard P, Lee C, Binnie M, and Julius M. 1992. Thymus-independent development and negative selection of T cells expressing T cell receptor alpha/beta in the intestinal epithelium: evidence for distinct circulation patterns of gut- and thymus-derived T lymphocytes. *J Exp Med* 176:187-199.
87. Poussier P and Julius M. 1994. Thymus independent T cell development and selection in the intestinal epithelium. *Annu Rev Immunol* 12:521-553.
88. Rocha B, von Boehmer H, and Guy-Grand D. 1992. Selection of intraepithelial lymphocytes with CD8 alpha/alpha co-receptors by self-antigen in the murine gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5336-5340.



89. Hayday A, Theodoridis E, Ramsburg E, and Shires J. 2001. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat Immunol* 2:997-1003.
90. Leonard WJ. 1999. Type I cytokines and interferons and their receptors. *Fundamental immunology, fourth edition* WE Paul, Editor. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia:741-774.
91. Peters M, Schirmacher P, Goldschmitt J, Odenthal M, Peschel C, Fattori E, Ciliberto G, Dienes HP, Meyer zum Buschenfelde KH, and Rose-John S. 1997. Extramedullary expansion of hematopoietic progenitor cells in interleukin (IL)-6-sIL-6R double transgenic mice. *J Exp Med* 185:755-766.
92. Shen MM, Skoda RC, Cardiff RD, Campos-Torres J, Leder P, and Ornitz DM. 1994. Expression of LIF in transgenic mice results in altered thymic epithelium and apparent interconversion of thymic and lymph node morphologies. *EMBO J* 13:1375-1385.
93. Zarling JM, Shoyab M, Marquardt H, Hanson MB, Lioubin MN, and Todaro GJ. 1986. Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:9739-9743.
94. Malik N, Haugen HS, Modrell B, Shoyab M, and Clegg CH. 1995. Developmental abnormalities in mice transgenic for bovine oncostatin M. *Mol Cell Biol* 15:2349-2358.
95. Vasse M, Pourtau J, Trochon V, Muraine M, Vannier JP, Lu H, Soria J, and Soria C. 1999. Oncostatin M induces angiogenesis in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1835-1842.
96. Clegg CH, Haugen HS, Rulffes JT, Friend SL, and Farr AG. 1999. Oncostatin M transforms lymphoid tissue function in transgenic mice by stimulating lymph node T-cell development and thymus autoantibody production. *Exp Hematol* 27:712-725.

97. Louis I, Dulude G, Corneau S, Brochu S, Boileau C, Meunier C, Cote C, Labrecque N, and Perreault C. 2003. Changes in the lymph node microenvironment induced by Oncostatin M. *Blood* In press.
98. Blais ME, Louis I, Corneau S, Gérard G, Terra R, and Perreault C. 2003. Extrathymic T Lymphocyte Development. *Exp Hematol* In press.
99. Terra R, Labrecque N, and Perreault C. 2002. Thymic and extrathymic T cell development pathways follow different rules. *J Immunol* 169:684-692.
100. Lyons AB and Parish CR. 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 171:131-137.
101. Gudmundsdottir H, Wells AD, and Turka LA. 1999. Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity. *J Immunol* 162:5212-5223.
102. Ludewig B, Ehl S, Karrer U, Odermatt B, Hengartner H, and Zinkernagel RM. 1998. Dendritic cells efficiently induce protective antiviral immunity. *J Virol* 72:3812-3818.
103. Homann D, Teyton L, and Oldstone MB. 2001. Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8<sup>+</sup> but declining CD4<sup>+</sup> T-cell memory. *Nat Med* 7:913-919.
104. Foulds KE, Zenewicz LA, Shedlock DJ, Jiang J, Troy AE, and Shen H. 2002. Cutting edge: CD4 and CD8 T cells are intrinsically different in their proliferative responses. *J Immunol* 168:1528-1532.
105. Ferreira C, Barthlott T, Garcia S, Zamoyska R, and Stockinger B. 2000. Differential survival of naive CD4 and CD8 T cells. *J Immunol* 165:3689-3694.

106. Lanzavecchia A and Sallusto F. 2000. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 290:92-97.
107. Viola A, Schroeder S, Sakakibara Y, and Lanzavecchia A. 1999. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* 283:680-682.
108. Lanzavecchia A and Sallusto F. 2001. Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. *Nat Immunol* 2:487-492.
109. Wells AD, Gudmundsdottir H, and Turka LA. 1997. Following the Fate of Individual T Cells throughout Activation and Clonal Expansion. *J.Clin.Invest.* 100:3173-3183.
110. Ku CC, Murakami M, Sakamoto A, Kappler J, and Marrack P. 2000. Control of homeostasis of CD8<sup>+</sup> memory T cells by opposing cytokines. *Science* 288:675-678.
111. Li XC, Demirci G, Ferrari-Lacraz S, Groves C, Coyle A, Malek TR, and Strom TB. 2001. IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo. *Nat Med* 7:114-118.
112. Refaeli Y, Van Parijs L, Alexander SI, and Abbas AK. 2002. Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes. *J Exp Med* 196:999-1005.
113. Hebib NC, Deas O, Rouleau M, Durrbach A, Charpentier B, Beaujean F, Vernant JP, and Senik A. 1999. Peripheral blood T cells generated after allogeneic bone marrow transplantation: lower levels of bcl-2 protein and enhanced sensitivity to spontaneous and CD95-mediated apoptosis in vitro. Abrogation of the apoptotic phenotype coincides with the recovery of normal naive/primed T-cell profiles. *Blood* 94:1803-1813.

114. Zarozinski CC, McNally JM, Lohman BL, Daniels KA, and Welsh RM. 2000. Bystander sensitization to activation-induced cell death as a mechanism of virus-induced immune suppression. *J Virol* 74:3650-3658.
115. McNally JM, Zarozinski CC, Lin MY, Brehm MA, Chen HD, and Welsh RM. 2001. Attrition of bystander CD8 T cells during virus-induced T-cell and interferon responses. *J Virol* 75:5965-5976.
116. Blais ME, Gérard G, Martinic MM, Roy-Proulx G, Zinkernagel RM, and Perreault C. 2003. Do thymic and extrathymic T cells generate similar immune responses? *In preparation*.
117. Hamilton SE and Harty JT. 2002. Quantitation of CD8+ T cell expansion, memory, and protective immunity after immunization with peptide-coated dendritic cells. *J Immunol* 169:4936-4944.
118. Gallimore A, Glithero A, Godkin A, Tissot AC, Pluckthun A, Elliott T, Hengartner H, and Zinkernagel R. 1998. Induction and Exhaustion of Lymphocytic Choriomeningitis Virus-specific Cytotoxic T Lymphocytes Visualized Using Soluble Tetrameric Major Histocompatibility Complex Class I-Peptide Complexes. *J.Exp.Med.* 187:1383-1393.
119. Ehl S, Klenerman P, Zinkernagel RM, and Bocharov G. 1998. The impact of variation in the number of CD8(+) T-cell precursors on the outcome of virus infection. *Cell Immunol* 189:67-73.
120. Hunziker L, Klenerman P, Zinkernagel RM, and Ehl S. 2002. Exhaustion of cytotoxic T cells during adoptive immunotherapy of virus carrier mice can be prevented by B cells or CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 32:374-382.
121. Moskophidis D, Battegay M, Bruendler MA, Laine E, Gresser I, and Zinkernagel RM. 1994. Resistance of lymphocytic choriomeningitis virus to alpha/beta interferon and to gamma interferon. *J Virol* 68:1951-1955.

122. Muller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, and Aguet M. 1994. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264:1918-1921.
123. Karrer U, Lopez-Macias C, Oxenius A, Odermatt B, Bachmann MF, Kalinke U, Bluethmann H, Hengartner H, and Zinkernagel RM. 2000. Antiviral B cell memory in the absence of mature follicular dendritic cell networks and classical germinal centers in TNFR1<sup>-/-</sup> mice. *J Immunol* 164:768-778.
124. Markowitz JS, Auchincloss H Jr, Grusby MJ, and Glimcher LH. 1993. Class II-positive hematopoietic cells cannot mediate positive selection of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2779-2783.
125. Dulude G, Brochu S, Fontaine P, Baron C, Gyger M, Roy DC, and Perreault C. 1997. Thymic and extrathymic differentiation and expansion of T lymphocytes following bone marrow transplantation in irradiated recipients. *Exp Hematol* 25:992-1004.

